

THESIS

MUNICH

1966

**Vergleichende Untersuchungen
über die Leistungsfähigkeit moderner
elektrophoretischer Analysemethoden
für die klinische Diagnostik**

Isichei

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

Aus dem Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung
München
Abteilung Priv.-Doz. Dr. K. Hannig

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE LEISTUNGSFÄHIGKEIT
MODERNER ELEKTROPHORETISCHER ANALYSENMETHODEN FÜR DIE
KLINISCHE DIAGNOSTIK.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Uche Peter Isichei
aus
Asaba/Nigeria

1966

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Dozent Dr. K. Hannig

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Th. Bücher

Dekan: Prof. Dr. med. R. Zenker

Tag der mündlichen Prüfung: 4. Oktober 1966
Note: Magna cum laude

Meinem lieben Vater

Francis Okofo Isichei



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von
Herrn Priv.-Doz. Dr. K. Hannig in der Zeit vom Oktober
1964 bis Juli 1966 an dem Max-Planck-Institut für Eiweiß-
und Lederforschung in München durchgeführt.

Herrn Priv.-Doz. Dr. K. H a n n i g
danke ich herzlich für sein Wohlwollen und die wertvollen
Ratschläge sowie die großzügige Förderung der Arbeit.

Meinem verehrten Lehrer,
Herrn Prof. Dr. P. K a r l s o n ,
danke ich für seine Empfehlung, aufgrund der ich die Mög-
lichkeit erhielt, diese Arbeit durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. W. G r a ß m a n n
danke ich für die Genehmigung, die Arbeit an seinem Institut
auszuführen, sowie für den Arbeitsplatz.

Frau Dipl.-Chem. G. P a s c h e r
danke ich für ihre Ratschläge in technischen Fragen sowie
für ihre Hilfe bei der Abfassung der Arbeit.

Meiner lieben Frau Elizabeth sei an dieser Stelle be-
sonders für die moralische Unterstützung gedankt

Frau C. Marchner danke ich für die angenehme Unterkunft
während meines Studienaufenthaltes in München.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. EINLEITUNG	1
I. <u>Allgemeines über die zur analytischen Auftrennung der Serumproteine geeigneten Elektrophoresemethoden</u>	1
II. <u>Aufgabenstellung</u>	9
B. VERSUCHE UND ERGEBNISSE	11
I. <u>Beschreibung der angewendeten Methoden</u>	11
1) Papierelektrophorese	11
2) Acetatfolienelektrophorese	12
3) Diskelektrophorese	14
4) Immunoelktrophorese	18
5) Trägerfreie kontinuierliche Elektro- phorese	21
II. <u>Ergebnisse</u>	22
1) Normalwerte und Ermittlung der Fehler- breiten bei der Papier- und der Acetatfolienelektrophorese	22
a) Papierelektrophorese	24
b) Acetatfolienelektrophorese	28
2) Zuordnung der diskelektrophoretisch aufgetrennten Serumproteinfraktionen zu den 5 "klassischen" Proteinfrak- tionen	29
a) Präparative Isolierung von Serum- proteinfraktionen	29
b) Auftrennung der präparativ ge- wonnenen Serumproteinfraktionen in der Diskelektrophorese	33
c) Vergleich der diskelektrophore- tischen Ergebnisse mit den immuno- elektrophoretischen Ergebnissen von Grabar	37

3) Untersuchungen pathologisch ver- änderter Sera nach den verschiedenen Methoden (Beurteilung im Hinblick auf diagnostische Aussagen)	42
C. DISKUSSION	69
D. EXPERIMENTELLER TEIL	81
E. ZUSAMMENFASSUNG	85
F. LITERATUR	87

A. EINLEITUNG

I. Allgemeines über die zur analytischen Auftrennung der Serumproteine geeigneten Elektrophoresemethoden.

Der Transport elektrisch geladener Teilchen in einem elektrischen Feld wird als Elektrophorese (1) bezeichnet. Während eine einzelne Aminosäure oder ein Proteinmolekül in saurer Lösung als Kation ($\text{R-CH} \begin{smallmatrix} \text{COOH} \\ \text{NH}_2^+ \end{smallmatrix}$) vorliegt und somit im elektrischen Feld in Richtung Kathode wandert, liegt es in alkalischem Milieu als Anion ($\text{R-CH} \begin{smallmatrix} \text{COO}^- \\ \text{NH}_2 \end{smallmatrix}$) vor und zeigt anodische Wanderungsrichtung.

Halten sich die positiven und die negativen Ladungen die Waage, so wandert das Molekül nicht. Der pH-Wert, bei dem dies der Fall ist, wird als isoelektrischer Punkt bezeichnet und ist charakteristisch für jedes Protein.

Durch die Wahl des pH-Wertes kann somit die Ladung verschiedener Proteine mit verschiedenen isoelektrischen Punkten und damit die Wanderungsrichtung und Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld verschieden beeinflusst werden. Die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit (v) ist proportional der Teilchenladung (e) und der Größe des elektrischen Feldes. Nach dem Stoke'schen Gesetz steht der treibenden Kraft ($e \cdot H$) ein Reibungswiderstand der Teilchen in der Lösung gegenüber, der von der Viskosität des Lösungsmittels (η) und dem Teilchenradius (r) abhängt.

$$v = \frac{e \cdot H}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta}$$

Tiselius (2) trennte in seiner bekannten, inzwischen technisch sehr verbesserten, U-Rohr-Anordnung erstmalig die Globuline von Humanserum in 3 Fraktionen (α , β , γ).

Der Kostenaufwand für die Tiselius-Apparatur sowie die Schwierigkeit der Bedienung verhindert jedoch die breite Anwendung dieser elektrophoretischen Analysenmethode. Die klassische Tiselius-Elektrophorese wird heute vornehmlich

zur genauen Messung elektrophoretischer Beweglichkeiten herangezogen, wobei die Wanderung in freier Lösung erfolgt.

In der technisch einfacher zu gestaltenden Trägerelektrophorese erfolgt dagegen die Wanderung in einem heterogenen System, z.B. Filtrierpapier. Die getrennten Zonen sind durch das Trägermaterial fixiert und können im Falle ungefärbter Substanzen nach der Trennung durch geeignete Anfärbung sichtbar gemacht werden. Die quantitative Auswertung der Papierelektropherogramme wird vorwiegend nach der von Graßmann und Hannig (3) entwickelten Photometermethode vorgenommen.

Die Zusammenhänge zwischen Wanderungsgeschwindigkeit, elektrophoretischer Beweglichkeit, pH und Ionenstärke gelten gleichermaßen für die freie wie für die Trägerelektrophorese. Im letzteren Falle existieren jedoch einige zusätzliche Faktoren, die auf die Beweglichkeit und die Trennschärfe einwirken: Diffusion, Adsorption, Zonenimperfection, Elektroosmose, Sogeffekte, Einflüsse durch Erwärmung und Verdunstung usw. (4). Obgleich die Bedeutung der elektrophoretischen Serumanalyse schon von Tiselius erkannt worden war, hat erst die einfach durchzuführende Papierelektrophorese (5) als Routinemethode Eingang in die klinischen Laboratorien gefunden.

Mit ihr können im allgemeinen 5 Proteinfraktionen (Albumin, α_1 -, α_2 -, β - und γ -Globulin) dargestellt werden, die sich unter krankhaften Bedingungen sowohl in qualitativer als auch in quantitativer Hinsicht verändern können. Es sind unzählige klinische Arbeiten erschienen, die sich mit den bei den verschiedensten Krankheiten auftretenden spezifischen Verschiebungen im Eiweißbild beschäftigen. (Ausführliche Zusammenfassungen siehe u.a. Wuhrmann-Wunderly (6), Riva (7), Dittmer (8), Wunderly (9)).

Obwohl man heute weiß, daß die Auftrennung in 5 Serumproteinfraktionen nur eine sehr grobe Fraktionierung darstellt, ist das Papierelektropherogramm für den Arzt in vielen Fällen auch heute noch ein wichtiges Hilfsmittel für die Diagnostik und für die Verfolgung des Krankheitsverlaufes.

Während das normale Bluteiweißbild als Euproteinämie bezeichnet wird, nennt Bennhold (10) das von der Norm abweichende Bild Pathoproteinämie, das er folgendermaßen unterteilt (vergl. Tab. 1):

Pathoproteinämie: a) Dysproteinämie (Störung der relativen Proportionen der Proteinkomponenten zueinander)

b) Heteroproteinämie (Vorliegen pathologischer Eiweißstoffe im Serum bzw. Plasma)

Auftreten von: 1) Paraproteinen (bei Myelom und Makroglobulinämie)
2) Alloproteinen (z.B. Haptoglobin, Cryoglobuline)
3) Immunantikörpern (Auftreten als Folge einer Infektion)

Die Kenntnisse über die Serumeiweißformel sind rein empirisch. Die genaue Natur und Bedeutung der pathologischen Veränderungen des Eiweißbildes ist in vielen Fällen nicht bekannt (7). Im Laufe der Jahre haben sich als Ergebnis ausgedehnter vergleichender Untersuchungen über die Bluteiweißkörper einige Reaktionskonstellationen (Reaktionstypen) herauskristallisiert, die dem Arzt wertvolle Anhaltspunkte liefern (6). Es sollen hier die wichtigsten Typen kurz erwähnt werden. Die papierelektrophoretischen Serumeiweißbilder sind in Abb. 1 zusammengefaßt und dem normalen Bild gegenübergestellt.

a) Typus der akuten Entzündung:

z.B. Pneumonie, akute Infekte und Infektionskrankheiten im Frühstadium, exsudative Lungentuberkulose, akute Polyarthritiden, Sepsis, Phlegmone, frische Herzmuskelinfarzierung und andere Nekrosen. Es wird eine deutliche Zunahme des α_2 -Globulins auf Kosten von Albumin beobachtet.

T a b e l l e 1

Übersicht über die Nomenklatur der Serumeiweißbildver-
änderungen (Riva (7))

	Normal	Abnorm			
		Pathoproteinämie (Dysproteinämie im weitesten Sinn)			
		Plasma	Serum		
Proteinogramm	Euproteinämie	Hypo-(A-) u. Hyperinnose	Defektdysproteinämie Analbuminämie Agammaglobulinämie Abetaglobulinämie	Paraproteinämie (und Paraproteinurie = B.-J.-Eiweiß) Myelom Makroglobulinämie WALDEN-STRÖM seltene Leukämieformen	Dysproteinämien im engeren Sinne
Proteinämie	Normoproteinämie			Hyperproteinämie	Hypo-, Normo-, Hyperproteinämie
Lipidogramm	normal	Die Semeiologie des pathologischen Glyko- und Lipidogramms ist heute noch nicht einwandfrei begründet			
Glykogramm	normal				

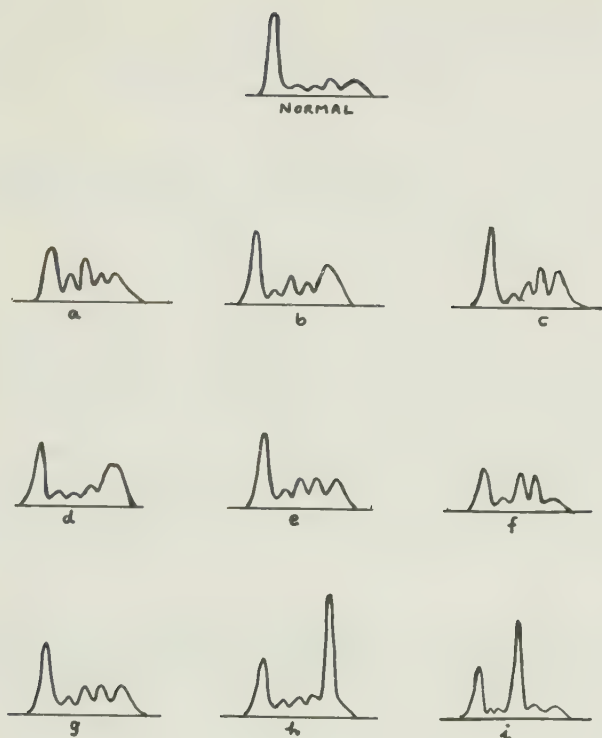


Abb. 1 Papiererelektrophoretische Kurvendiagramme von Normalserum und den Sera verschiedener Konstellationstypen (6).

a) Typus der akuten Entzündung; b) Typus der subakut-chronischen entzündlichen und proliferativen Prozesse; c) Typus der Hepatitis; d) Typus der Lebercirrhose; e) Typus des Okklusionsicterus; f) Typus des nephrotischen Symptomkomplexes; g) Typus der malignen Tumoren; h) Typus des γ -Globulin-Plasmocytoms; i) Typus des B-Globulin-Plasmocytoms.

In späteren Stadien tritt γ -Globulin-Vermehrung auf.

b) Typus der subakut-chronischen entzündlichen und proliferativen Prozesse:

z.B. Ablaufende Pneumonien, Infektionskrankheiten im Abklingen, chronische Lungentuberkulose und andere chronische Infektionskrankheiten, chronische Cystitis, Pyelitis, Cholecystitis, chronische Endokarditiden.

c) Typus der Hepatitis:

z.B. Hepatitis und Folgezustände, toxische Leberzellschädigungen, hämolytische Prozesse, gewisse Formen von Polyarthritiden, Dermatosen, gewisse Fälle von Leukämien und malignen Tumoren der blutbildenden oder der lymphatischen Gewebe.

d) Typus der Lebercirrhose:

Laennec'sche Lebercirrhose, posthepatische Cirrhose und chronische Hepatiden, Stauungscirrhose, cholangitische Cirrhose, schwere indurative Lungen-Tbc, Sepsis lenta, Kala-Azar und andere chronisch-entzündliche und zu Narbenbildung führende Prozesse, gewisse Formen chronischer Polyarthritiden und Kollagenosen. Das typische Bild der Laennec'schen Lebercirrhose ist gekennzeichnet durch eine deutliche Zunahme des γ -Globulins (mit breitbasigem hohem Gipfel) auf Kosten von stark vermindertem Albumin, wobei der Gesamteiweißgehalt je nach Schwere des Falles vermindert ist und direkte prognostische Schlüsse zuläßt.

e) Typus des Okklusionsicterus:

z.B. Verschluss-Icterus bei Karzinom der Gallenwege oder der Pancreas, Gallensteinverschluss, mechanischer Verschluss der ableitenden Gallenwege durch entzündliche Prozesse.

f) Typus des nephrotischen Symptomkomplexes:

z.B. Genuine oder Lipoidnephrose, Amyloidnephrose, Nephritis, Nephrosklerose oder diabetische Glomerulosklerose mit nephrotischem Einschlag (sogenannte Pseudonephrose), seltene Formen von hepato-renalen Zustandsbildern, Schwangerschaftstoxikose, schwerste terminale Lungen-Tbc und Kachexien.

g) Typus der malignen Tumoren (Neoplasien ohne starke Leberbeteiligung):

z.B. Karzinome, besonders im Metastasen-Stadium, Sarkome mit Ausnahme der Plasmocytome.

Die Vermehrung der Globulin-Unterfraktionen β -, γ - und besonders α_2 -Globulin ist wechselnd und geht auf Kosten von Albumin. Im Endstadium überwiegt die γ -Zunahme. Das Bild der malignen Tumoren hängt weitgehend vom Stadium, von der Lokalisation der Metastasen (Leber) und eventuellen Einschmelzungsprozessen (α_2 -Globulinvermehrung) ab und ist keineswegs spezifisch. Vorsicht bei

der Interpretation ist hier besonders am Platze. Oft besteht durch längere Zeit eine Vermehrung des α_2 - oder des γ -Globulins, bzw. eine gleichzeitige Vermehrung beider Fraktionen, ein Bild, wie es bei vielen chronisch-entzündlichen Krankheitsbildern auftritt, wobei aber die klinisch oft brennende diagnostische Fragestellung leider nicht aufgeklärt wird. Dagegen ist das Ausmaß der Dysproteinämie prognostisch oft zu verwerten.

h) Typus des γ -Globulin-Plasmocytoms:

z.B. γ -Plasmocytom (häufigste Form), Makroglobulinämie Waldenström.

i) Typus des β -Globulin-Plasmocytoms:

z.B. β_1 -Plasmocytom, β_1 -Plasmazellen-Leukämie, Makroglobulinämie Waldenström.

Die Einordnung der 5 Fraktionen zeigenden papierelektrophoretisch ermittelten Serumeiweißbilder in die erwähnten Konstellationstypen gibt dem Arzt in Verbindung mit anderen Untersuchungen wertvolle Anhaltspunkte.

Schon die genaue Analyse der nach Tiselius erhaltenen Gradientendiagramme ließ jedoch über 10 verschiedene Serumeiweißbestandteile vermuten (Wiedemann (11), Berry und Chanutin (12)).

Man konnte daher annehmen, daß eine bessere Auftrennung der Serumproteine in 10 und eventuell mehr Proteinfractionen auch detailliertere diagnostische Möglichkeiten bieten würde. Es wurden deshalb in den folgenden Jahren große Anstrengungen gemacht, die Trennleistung der Papierelektrophorese durch Variation der Versuchsbedingungen zu verbessern bzw. neue Methoden zu finden, die eine weitergehende Fraktionierung der Serumproteine ermöglichen.

So wurde versucht, die für die Adsorption der Proteine verantwortlichen Gruppen (Aldehyd-, Hydroxyl-) der Cellulose durch Bindung an andere Substanzen unschädlich zu machen. Micheel und Schweppe (13) acetylierten die Cellulose, Datta und Mitarbeiter (14) schlugen eine Imprägnierung des Papierses mit Al_2O_3 und Gelatine vor. Auch durch Veresterung mit Diazomethan, andererseits durch Behandlung des Papierses mit Äthylendiamintetraessigsäure wurde versucht, die Trenneigenschaften des Papierses zu verbessern. Aronsson und Grönwall (15) konnten mit Hilfe eines Tris-EDTA-Borsäure-Puffers 9 Proteinfractionen erhalten.

Die von Kohn (16) eingeführten Zellulose-Acetat-Folien brachten ebenfalls einen gewissen Fortschritt. Im menschlichen Normalserum konnten bis zu 8 Eiweißfraktionen festgestellt werden. Trotz kürzerer Trennzeiten bei Verwendung von Folien blieb diesen jedoch eine breite Anwendung bisher versagt. Dies mag einerseits bedingt sein durch die höheren Kosten der Folien, andererseits durch die Tatsache, daß sich gegenüber der Papierelektrophorese keine diagnostischen Vorteile ergeben.

1955 berichtet Smithies (17) über die Anwendung von Stärkengel als Trägermaterial für elektrophoretische Trennungen. Die Anwendung der Methode auf Blutserum erbrachte gegenüber der Papier- und der Folienelektrophorese wesentlich verbesserte Trennergebnisse. So konnten etwa 20 Serumproteinfraktionen mit dieser Technik erhalten werden. Fast gleichzeitig entwickelten Grabar und Williams (18) die Methode der Immunoelktrophorese, die eine Kombination eines physikalisch-chemischen und eines immunchemischen Untersuchungsverfahrens darstellt. Die Proteingemische werden zunächst in Agargel elektrophoretisch aufgetrennt und dann der Einwirkung eines präzipitierenden Antiserums ausgesetzt. Mit Hilfe der Immunoelktrophorese konnten im normalen Humanserum mindestens 18 Präzipitationsbänder nachgewiesen werden.

Der immunologische Nachweis von Serumproteinen hat sowohl für die klinische Diagnostik als auch für biochemische Fragestellungen, ja sogar für forensische Untersuchungen in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen.

Proteine sind - wenn auch nicht die einzigen - die typischsten Antigene. Fast alle bisher untersuchten Proteine haben antigene Wirksamkeit. Ausnahmen bilden einige spezielle sehr niedermolekulare Eiweißstoffe (z.B. Histone, Protamine). Die immunologischen Methoden sind durch hohe Spezifität und Empfindlichkeit ausgezeichnet. So genügt nach Doerr (19) schon die subkutane Applikation von 1 μ g eines Serumproteins zur Sensibilisierung eines Meerschweinchens mittleren Gewichtes. Es können also mit dieser empfindlichen Methode mit physikalischen Verfahren nicht erfaßbare Proteinspuren nachgewiesen werden.

Nachteile der Verwendung von Stärke oder Agar sind die wegen der relativ geringen Transparenz fehlende Möglichkeit einer exakten quantitativen Auswertung und weiterhin die wechselnden Verunreinigungen der nicht analysenreinen Materialien, die trotz guten Auswaschens zu unvorhergesehenen Effekten führen können (20).

1959 benützten erstmals Raymond und Weintraub (21) Acrylamidgel als Trägersubstanz für elektrophoretische Trennungen. Es handelt sich um ein wasserklares elastisches Gel, welches durch Polymerisation von Acrylamid und N,N-Methylenbisacrylamid unter Zusatz von Ammoniumpersulfat entsteht. Die Verwendung dieses Gels in der sogenannten Diskelektrophorese (22) ist heute weit verbreitet und es gelingt damit, die Serumproteine in einem einzigen Versuch in 20 und mehr Fraktionen aufzuteilen, die sich quantitativ densitometrisch erfassen lassen. Dabei treten jedoch schwierige Fragen der Benennung und Zuordnung der neu entdeckten Proteinfractionen auf. Man kann aber erwarten, daß nach Standardisierung der Versuchsbedingungen und nach Vorliegen einer ausreichenden Anzahl von Ergebnissen die Diskelektrophorese an Polyacrylamidgel ähnlich wie die Papierelektrophorese im klinischen Labor ihren Platz finden wird.

II. Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit soll zunächst die Leistungsfähigkeit der einzelnen gebräuchlichsten Serumelektrophoresemethoden (Papierelektrophorese, Acetatfolienelektrophorese, Diskelektrophorese, Immunoelktrophorese) überprüft und miteinander verglichen werden.

Dazu ist es notwendig, vergleichende Untersuchungen über die Trennschärfe (Anzahl der Fraktionen sowie die quantitative Reproduzierbarkeit) durchzuführen.

Weiterhin soll bei einigen typischen Krankheitsbildern geprüft werden, inwieweit die immunoelktrophoretisch bzw.

die diskelektrophoretisch erhaltenen Serumeiweißbilder weitergehende diagnostische Aussagen zulassen, als die papierelektrophoretisch ermittelten.

Dazu muß zunächst eine eindeutige Zuordnung der in der Diskelektrophorese auftretenden Proteinzonen zu den 5 klassischen Proteinfractionen vorgenommen werden.

B. VERSUCHE UND ERGEBNISSE

I. Beschreibung der angewendeten Methoden

1) Papierelektrophorese

Die Versuche wurden in der Trennkammer von Graßmann und Hannig (23) durchgeführt. Die aus Vinidur hergestellte Anordnung besteht aus der Trennkammer mit einem herausnehmbaren Rahmen, der zur Aufnahme von 2 Streifen bestimmt ist und den seitlich anschließenden Elektrodenräumen mit den Platinelektroden. Die Papierstreifen befinden sich in der Kammer in horizontaler Lage und tauchen mit ihren Enden in die beiden Elektrodenräume. Durch Unterteilung der Elektrodenräume ist dafür gesorgt, daß keine Veränderungen der Elektrolytzusammensetzung im inneren Kammerteil und damit auf dem Papierstreifen entstehen. Die Trennkammer ist mit einem Glasdeckel dicht verschließbar. Zur Trennung von Serumproteinen wurde Veronalpuffer pH 8,6 verwendet.

Auf dem Papierstreifen wird zunächst die Auftragstelle mit Bleistift markiert (etwa 11 cm vom Ende entfernt wird ein parallel zur Schmalseite verlaufender Strich gezogen) und der Streifen dann mit Pufferlösung gleichmäßig getränkt. Die Oberfläche soll eben matt glänzen. Dann wird der Streifen auf den Rahmen gespannt. Das Auftragen des Serum (0,006 ml) geschieht mittels Mikropipette, wobei darauf zu achten ist, daß das Analysenmaterial über 3,0 - 3,5 cm des 4 cm breiten Streifens gleichmäßig verteilt ist. Der beschickte Rahmen wird mit der Auftragstelle zur Anode in die Kammer gestellt, diese wird sofort verschlossen und an die Stromquelle - ein Spannungs-stabilisiertes Gerät - angeschlossen. Die Trennung dauert bei einer Klemmenspannung von 110 V 14 - 16 Stunden, durch einen Streifen fließt dabei ein Strom von etwa 1 mA.

Nach Beendigung der Elektrophorese läßt man die Streifen auf dem der Kammer entnommenen Rahmen 1/2 - 1 Stunde in waagerechter Lage an der Luft trocknen, bevor sie für 10 - 15 Minuten in einen Trockenschrank von 100° C gebracht werden.

Die Anfärbung erfolgt nach der von Graßmann und Hannig angegebenen Methode mit Amidoschwarz 10 B (3). Die Streifen werden 10 Minuten unter leichter Bewegung

gefärbt, anschließend wird der nicht an Protein gebundene Farbstoff innerhalb etwa 4 Stunden mit wiederholt gewechselter Waschlüssigkeit entfernt. Die Streifen werden getrocknet.

Zur quantitativen Auswertung werden die absolut trockenen Streifen mit Transparenzöl getränkt (Vakuum) und blasenfrei zwischen 2 Glasplatten gebettet (3). Die eigentliche Auswertung (Extinktionsmessung) erfolgte mit dem "Extinktionsschreiber" der Fa. C. Zeiss. Die photometrisch erhaltene Kurve wird nach Festlegung der Basislinie in Gaußkurven zerlegt. Die Bestimmung der Flächeninhalte der abgegrenzten Fraktionen geschieht durch Umfahren mit einem Planimeter. Die Relationen der Planimeterzahlen der einzelnen Fraktionen eines Streifens entsprechen deren Proteinkonzentrationen.

2) Acetatfolienelektrophorese

Die Acetatfolienelektrophorese wurde in 2 Variationen durchgeführt.

a) Die elektrophoretische Trennung erfolgte in der im Abschnitt "Papierelektrophorese" beschriebenen Anordnung von Hannig. Anstelle der zur Halterung der Papierstreifen verwendeten Brücke wurde lediglich eine zur Aufnahme der kurzen Membranfolien (20 x 100 mm) geeignete verwendet. Die Stromführung zwischen Elektrodenraum und Folie geschieht durch Filterpapierstreifen. (Die Folie soll dabei auf dem Papier liegen).

Der Membranstreifen wird nach Markierung der Auftragsstelle mit weichem Bleistift seitlich so langsam in die zur Trennung verwendete Pufferlösung (Veronalpuffer pH 8,6; Ionenstärke 0,05) getaucht, daß sich keine Lufteinschlüsse bilden. Der zwischen Filtrierpapier abgetrocknete Streifen wird auf die mit Puffer befeuchtete Brücke der Elektrophoresekammer gelegt. Das Auftragen des Serum erfolgt wie oben geschildert, ebenso der Anschluss der Trennkammer an den Gleichrichter. Die Trennzeit betrug bei 400 Volt 2 Stunden. Nach der Trennung werden die Folien in horizontaler Lage 5 Minuten bei 100° C im Trockenschrank getrocknet. Anfärbung und Auswaschen des Acetatfolienstreifens geschieht wie bei Papierstreifen. Das Auswaschen geht innerhalb von 15 Minuten vor sich. Der völlig trockene Streifen wird in ein Spezial-Transparenzöl gelegt, wobei er völlig glasklar wird und kann, wie oben beschrieben, photometrisch ausgewertet werden.

b) Die Serumelektrophorese wurde auch in der von Beckman (24) entwickelten "Microzone Electrophoresis Cell" durchgeführt (siehe Abb. 2). Die kleine, gut durchdachte Apparatur (13 x 10 x 9 cm) besteht aus der eigentlichen Trennkammer, der zur Aufnahme der Acetatfolie bestimmten Brücke und den 2 Deckeln. Die Brücke enthält 2 Zahnleisten, die zur Halterung und Spannung der für 8 gleichzeitige Analysen geeigneten Folie (14 x 5,5 cm; Trennstrecke 6,5 cm) dienen. Das Aufbringen der Analysensubstanz erfolgt mittels eines speziellen Applikators, der es aufgrund des Prinzips der Kapillarattraktion ermöglicht, stets gleiche Mengen der Analysenproben (0,25 ul) aufzubringen.

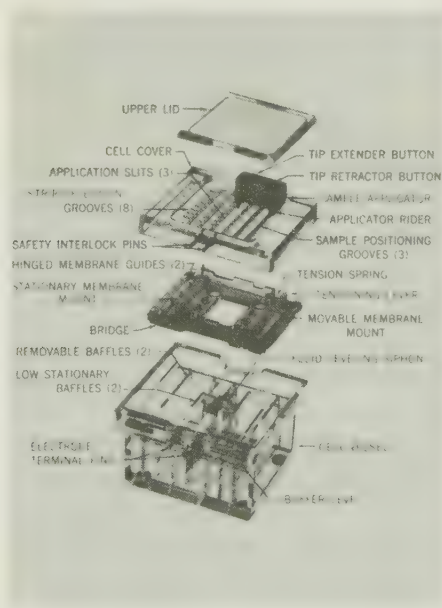


Abb. 2 Membranfolien-Elektrophoreseapparatur (Microzone Cell)
von Beckman (24).

Zunächst wird die Kammer blasenfrei mit Veronalpuffer pH 8,6, Ionenstärke 0,075 gefüllt. Dann wird die Acetatfolie wie schon beschrieben unter Vermeidung von Luft einschläüssen mit Puffer getränkt, der überschüssige Puffer abgetupft und die Folie in die Brücke eingespannt. Die Brücke wird in die Kammer gesetzt, so daß die überstehenden Enden der Folie in die Pufferlösung eintauchen. Der untere Deckel auf den der Applikator aufgesetzt wird, wird sofort auf die Kammer gebracht. Nachdem die Analysenproben aufgetragen wurden und die Kammer mit dem oberen Deckel verschlossen ist, wird diese an die Stromquelle angeschlossen. Die Laufzeit beträgt bei 250 Volt 20 Minuten. Der Strom soll dann nicht höher als auf 5 mA gestiegen sein. Nach erfolgter Trennung wird die Membran sofort für 10 - 15 Minuten in die Färbelösung gebracht, dann 3 mal je 2 - 3 Minuten entfärbt. Wenn der Untergrund des Streifens praktisch farblos ist, kommt er für 1 Minute in 95 % Äthanol, anschließend für 1 Minute in frisch bereitete Clearing-Lösung. Die Färb- und Waschbäder sollen ständig bewegt werden. Nach dem letzten Bad wird die Folie auf einer Glasplatte glattgestrichen und bei 110 - 120 °C getrocknet.

Die quantitative Auswertung kann zwar mit mäßiger Genauigkeit in einem Spezialdensitometer erfolgen, im allgemeinen eignen sich jedoch die Mikroelektropherogramme nur für eine visuelle Betrachtung bzw. Beurteilung.

3) Diskelektrophorese

Die Diskelektrophorese wurde nach dem Prinzip von Raymond (25) in der Apparatur von Canalco "Model 12 System", die die gleichzeitige Untersuchung von 12 Proben gestattet, durchgeführt. Zur Trennung der Serumproteine wurde Tris-puffer (pH 8,3) verwendet. Die Abb. 3 zeigt eine schematische Darstellung der Diskelektrophoreseanordnung.

Die Apparatur besteht im Prinzip aus dem oberen Elektrodenraum, der am Boden 12 kreisförmig angeordnete Öffnungen, die zur Aufnahme der Acrylamidgelröhrchen dienen, besitzt und dem unteren Elektrodenraum. In den oberen Elektrodenraum taucht eine als Kathode fungierende Platinelektrode, im unteren Elektrodenraum ist die Anode angebracht. Während des Versuches stehen Kathoden- und Anodenraum über die Gelröhrchen in Verbindung. Die elektrophoretische Trennung

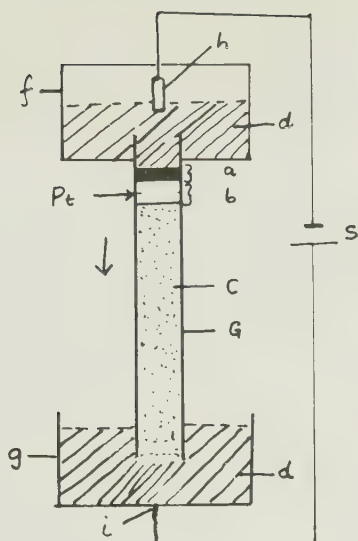


Abb. 3 Schematische Darstellung der Diskelektrophorese-apparatur.

a) Probegel; b) Sammelgel; c) Trenngel; d) Pufferlösung; f) oberes Elektrodengefäß; g) unteres Elektrodengefäß; h) Kathode; i) Anode; S) Stromquelle; G) Glasrohr; Pt) konzentrierte Proteinzone; ↓ Wanderungsrichtung.

findet in mit Acrylamidgel beschickten Glasröhrchen (Länge 100 mm; l.W. 5 mm) statt. Die Füllung besteht aus 3 Schichten: Im feinporigen "lower gel" (Trenngel) findet die eigentliche Auftrennung statt, während das großporige "upper gel" (Sammelgel) dazu dient, die Analysenprobe zu konzentrieren, das heißt, auf eine möglichst schmale Zone zusammenzudrängen. Das Probegel schließlich dient zur Aufnahme der Analysensubstanz.

Die Präparation der Gelröhrchen wird folgendermaßen vorgenommen: Die fettfreien Röhrchen werden in unten verschlossene Gummikappen gesteckt und genau senkrecht aufgestellt. (Da die Polymerisationsgeschwindigkeit sehr stark temperaturabhängig ist, müssen die Stämm-lösungen vor dem Mischen auf Raumtemperatur gebracht sein. Ebenso sollen - um Gelröhrchen gleichbleibender Trenneigenschaften und damit reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten - die Präparationszeiten genau eingehalten werden).

Dann werden sie zu etwa $3/4$ mit frisch vorbereitetem lower gel basenfrei gefüllt, das vorsichtig mit etwas Wasser überschichtet wird. Die Wasserschicht verhindert ein Hochsteigen der Gelschicht an der Glaswand, wodurch eine für scharfe Trennungen unerlässliche völlig ebene Oberfläche des Trenngels erreicht wird. Die so gefüllten Stäbchen bleiben 40 Minuten senkrecht bei Raumtemperatur stehen, wobei die Polymerisation stattfindet. Die schon nach einigen Minuten auftretende Trübung des ursprünglich glasklaren Gels zeigt den Beginn der Polymerisation an. Nach beendeter Polymerisation des lower gel wird das überschichtete Wasser mittels Injektionsspritze vorsichtig entfernt. Der nicht gefüllte obere Teil der Röhrchen wird mit dem frisch bereiteten upper gel ausgespült und dann mit etwa 0,2 ml dieses Gels beschickt. Es wird aus den bereits erwähnten Gründen wieder mit 0,1 ml Wasser überschichtet. Die Polymerisation des upper gel geht unter Bestrahlung mit UV-Licht (Quarzlampe, Hanau) vor sich. Dazu werden die senkrecht stehenden Röhrchen von oben aus einer Entfernung von 3 cm bestrahlt. Die Photopolymerisation zeigt sich bereits nach 5 Minuten durch Auftreten einer Opaleszenz der ursprünglich durch den Riboflavinzusatz grünlich gefärbten Schicht an und ist nach 15 Minuten beendet. Erfahrungsgemäß werden schärfere Trennungen erhalten, wenn die Stäbchen vor dem Aufbringen des Probegels 1 Stunde stehen bleiben.

Anschließend wird das überschichtete Wasser wieder vorsichtig entfernt und das Probegel, das nicht mehr als 200 μ g Protein in der aufgetragenen Menge (0,15 ml) enthalten soll, aufgebracht. (Zur Vermeidung eventueller Denaturierung der Proteine verzichtete ich auf die Photopolymerisation dieser Schicht. Durch Zuckerzusatz zum Probegel kann dessen Dichte erhöht werden, wodurch ein Aufwirbeln bei dem später sehr vorsichtig vorzunehmenden Auffüllen des Röhrchens mit Elektrophoresepuffer vermieden werden kann.)

Die Stäbchen werden aus der Gummikappe genommen und von unten in die mit Gummidichtungen versehenen Öffnungen des oberen Elektrodenraumes gesteckt. Während der untere Elektrodenraum bereits vor dem Einsetzen der Röhrchen mit Puffer gefüllt sein kann, wird der obere erst nach dem völligen Auffüllen der Röhrchen soweit gefüllt, daß die Kathode eintaucht. Die Röhrchen sollen etwa 2 cm tief in den Anodenpuffer eintauchen, wobei sich zwischen

Gel und Puffer ebenfalls keine Luftblase befinden darf. Nun wird die Apparatur an die Stromquelle angeschlossen. Es sollen bei einer Spannung von 150 Volt nicht mehr als 2-5 mA pro Röhrchen fließen. Es empfiehlt sich, dem Kathodenpuffer 1 ml einer 0,001 % Bromphenolblaulösung als Markierungsstoff zuzusetzen. Der Farbstoff hat unter den Versuchsbedingungen etwa die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit wie Albumin. Auf diese Weise kann die richtige Trennzeit einfach ermittelt werden. Nach beendeter Elektrophorese werden die Röhrchen 5 - 10 Minuten auf Eis gelegt. Dann wird das Gel vorsichtig aus dem Röhrchen geschoben. Die Färbung und gleichzeitige Fixierung muß sofort erfolgen, um eine Diffusion der getrennten Fraktionen zu unterbinden. Dazu werden die Gelstäbchen in Reagenzgläsern in 1 % Amidoschwarzlösung 1 Stunde lang gefärbt. Die Entfärbung geschieht mit 7 % Essigsäure im Laufe von 12- 16 Stunden. Die Präparate sind in dest. Wasser praktisch unbegrenzt haltbar.

Zur quantitativen Auswertung der angefärbten Diskelektrophogramme existieren wohl spezielle Densitometer (z.B. Canalco). Da mir keines der recht kostspieligen Geräte zur Verfügung stand, habe ich versucht, den zur Auswertung der Papierelektrophogramme bestimmten "Elphor-Integraphen" für diesen Zweck zu benutzen. Ich ließ mir in der Institutswerkstatt einen Metallschlitten mit einer Zahnschiene für 0,5 mm Vorschub anfertigen. Auf eine Glasplatte (21 x 150 mm) klebte ich mit Silikonkleber parallel zu den Längsseiten Glasstreifen von 3 mm Höhe auf. Mit Hilfe von verschiebbaren Plexiglasstreifen zum Abschluss an den Schmalseiten erhielt ich eine Küvette von 10 mm Breite, 3 mm Höhe und variabler Länge. In dieses Bett wurde das Gelstäbchen gelegt und mittels einer Deckglasplatte flachgedrückt. Das Ganze wird mittels Metallfedern im Rahmen gehalten. Bei einiger Übung gelingt das Einbringen des Geles ohne Verschiebung oder Verzerrung der Zonen. Das Photometer schreibt die Extinktionskurve des Streifens unter Verlängerung der Grundlinie um den Faktor 2.

Die Leistungsfähigkeit des Auswertgerätes war jedoch zu gering, um mit kleineren Spaltbreiten als 1 mm arbeiten zu können. Deshalb können die bei der Diskelektrophorese auftretenden z. Teil sehr schmalen Banden nicht exakt erfaßt

werden und erscheinen unter Umständen nicht als Gipfel, sondern eventuell nur als Schulter. Außerdem erscheinen bei der großen Spaltbreite des Auswertgerätes - wie leicht einzusehen ist - im Kurvendiagramm die Gipfel der schmalen Fraktionen zu niedrig.

Aus diesen Gründen habe ich versucht, die Auswertung der Diskelektropherogramme auf anderem Wege vorzunehmen.

Es wurden entsprechend vergrößerte Filmpositive der Gelstäbchen angefertigt, die dann - die Banden sind nun genügend verbreitert - in dem zur Auswertung der Papierelektropherogramme verwendeten Zeiss-Auswertgerät durchgemessen werden können. Dieses zwar nur halbquantitative Verfahren - die Höhe der Gipfel hängt ja von der Qualität der Vergrößerung ab - ermöglicht eine exakte Lokalisierung der Fraktionen, wobei praktisch alle Banden erfaßt werden. Abb. 4 zeigt eine Gegenüberstellung der nach den beiden durchgeführten Auswertmethoden erhaltenen Kurvendiagramme ein und desselben Gelstäbchens.

4) Immunoelektrophorese

Ich arbeitete nach der Mikromethode von Scheidegger (26) in der Modifikation von Schwick (27).

Die elektrophoretische Trennung des Serums wurde in der etwas modifizierten, mit einer speziell dafür geeigneten Brücke ausgestatteten Elektrophoreseapparatur von Graßmann und Hannig unter Verwendung von Veronalpuffer (pH 8,6; Ionenstärke 0,1) durchgeführt.

Völlig fettfreie Objektträger werden abgeflammt. Auf die heißen Objektträger werden je 3 ml der im experimentellen Teil beschriebenen Agarlösung mittels Pipette aufgebracht. Man läßt sie in einer feuchten Kammer im Kühlraum erstarren (etwa 1/2 Stunde). In der Mitte der Schicht wird eine 5,5 cm lange und 1 mm breite Rinne, weiterhin 2 Löcher mit etwa 1 mm Durchmesser ausgestanzt (siehe Abb. 5).

Die Objektträger werden auf die in der Trennkammer stehende Brücke gelegt. Durch Auflegen von Filterpapierstreifen, deren andere Seiten in die Elektrodenräume tauchen, auf die Schmalseiten der Agarschicht wird leitende Verbindung hergestellt. In eins der ausge-

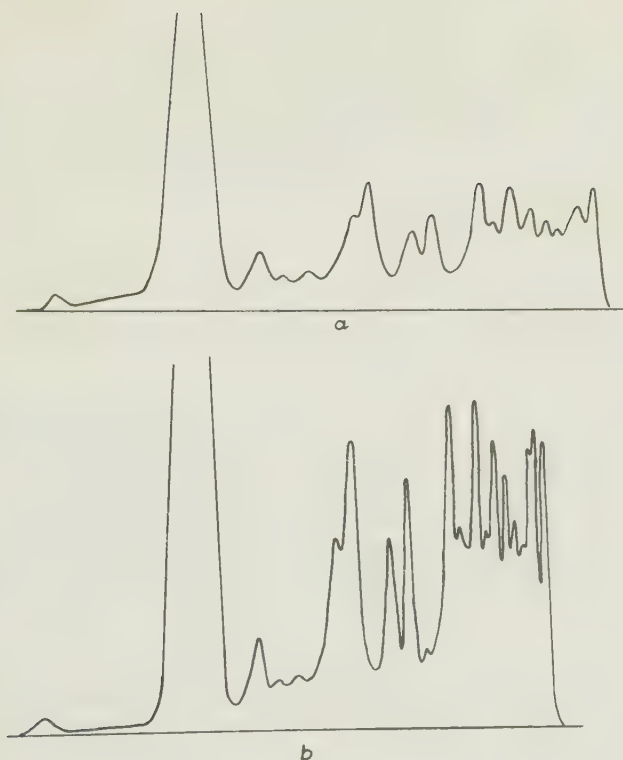


Abb. 4 Kurvendiagramme eines Diskelektropherogrammes.
a) Direktphotometrie des Gelstäbchens; b) Photo-
metrie des Filmpositivs.

stanzten Löcher wird das zu untersuchende Serum, in das andere ein Vergleichsserum oder eine Vergleichssubstanz gefüllt. Auf diese Weise können Doppelbestimmungen eines Antigens oder Vergleichsbestimmungen verschiedener Proteine vorgenommen werden. Nachdem die Kammer bedeckt ist, wird sie an die stabilisierte Stromquelle angeschlossen. Es sollen pro Objektträger 5 mA fließen. Die Trennung dauert

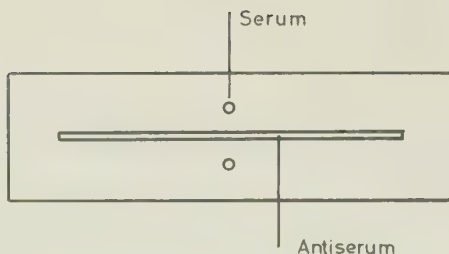


Abb. 5 Skizze eines zur Immunoelektrophorese vorbereiteten Agarobjektträgers.

2 1/2 - 3 Stunden. Albumin und die α -Globuline wandern anodisch, während β - und γ -Globulin infolge der starken Elektrosmose in Richtung Kathode wandern. Nach der elektrophoretischen Trennung wird der Objektträger in eine feuchte Kammer gelegt und der Kanal mit Antiserum beschickt. Nach 10 - 16 Stunden ist das Antiserum im allgemeinen genügend in das Gel diffundiert. Die Präzipitationslinien von Humanserum und Antiserum erscheinen meist innerhalb 24 Stunden. Es gibt jedoch auch Fälle, bei denen sich die Präzipitation bis zu 5-7 Tagen verzögert.

Durch Einlegen des Objektträgers in physiologische Kochsalzlösung für 12 - 24 Stunden wird das überschüssige Antiserum ausgewaschen. Der Objektträger wird gut mit Wasser abgespritzt und die Oberfläche der Agarschicht mit einem Streifen feuchten Filtrierpapiers bedeckt. Man läßt im mäßig warmen Luftstrom trocknen, wonach das Deckpapier von selbst abfällt. Die Anfärbung der Präzipitationszonen erfolgt in einem Färbebad von Amidoschwarz 10 B innerhalb von 20 Minuten. Der überschüssige Farbstoff wird mittels 1 % Essigsäure eluiert, was 2 - 5 Stunden in Anspruch nimmt.

Die kurz abgespritzten Objektträger werden an der Luft getrocknet und können so über lange Zeit aufbewahrt werden.

Die Anzahl der erscheinenden Präzipitationszonen entspricht der Zahl der anwesenden Antigene, sofern das Antiserum für jedes im Serum vorhandene Antigen einen Antikörper enthält.

Zahl und Intensität der Präzipitationszonen ist also auch abhängig von der Qualität des Antiserum.

Trotz der vielen unternommenen Versuche einer quantitativen Auswertung der Immunoelktropherogramme ist das Problem nicht gelöst. Es ist jedoch möglich, aufgrund von Immunoelktropherogrammen bekannter Zusammensetzung und Konzentration der Komponenten halbquantitative Aussagen zu machen.

5) Trägerfreie kontinuierliche Elektrophorese

Um auf der Basis vergleichender Untersuchungen eine Zuordnung der diskelektrophoretisch aufgetrennten Serumproteinfraktionen vornehmen zu können, mußten die 5 Hauptkomponenten (Albumin, α_1 -, α_2 -, β -, γ -Globulin) präparativ aus Humanserum hergestellt werden. Diese Auftrennung wurde in der von Hannig (28) entwickelten trägerfrei und kontinuierlich arbeitenden Apparatur durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode (siehe Abb. 6) besteht darin, daß quer zu den Kraftlinien eines elektrischen Feldes eine Pufferlösung von geeignetem pH strömt. Das zu trennende Gemisch wird kontinuierlich an einer geeigneten Einspritzstelle dem strömenden Medium zugeführt, so daß die Komponenten mit unterschiedlicher elektrophoretischer Beweglichkeit verschieden stark abgelenkt und an verschiedenen Stellen nach Verlassen der Apparatur entnommen werden können.

Die Trennkammer besteht aus 2 in einem Abstand von 0,5 mm gehaltenen Glasplatten (50 x 50 cm). Durch 6 entsprechend verteilte Bohrungen entlang des oberen Randes der oberen Glasplatte wird mittels einer 6-fach-Schlauchpumpe gleichförmig Puffer in die Kammer gedrückt, der diese laminar mit konstanter Geschwindigkeit durchströmt. Am unteren Ende werden mit Hilfe einer hier nicht näher zu erläuternden Entnahmeverrichtung 50 Fraktionen gesammelt. An beiden Seiten ist die Trennkammer durch Elektrodenkammern, die die Platinelektroden enthalten, abgeschlossen. Zwischen Trennkammer und Elektrodenräumen liegen Ionenaustauschermembranen, die die Vermischung von Elektroden- und Kammerpuffer verhindern, andererseits den Stromtransport ermöglichen. Das Substanzgemisch wird durch eine der

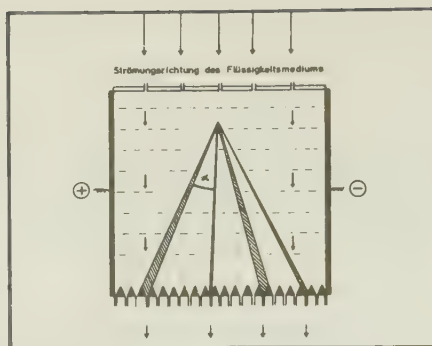


Abb. 6 Prinzip der Ablenkungselektrophorese.

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{\text{elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit (v)}}{\text{Strömungsgeschwindigkeit der Pufferlösung (w)}}$$

vorgesehenen Öffnungen der Trennregion mittels einer Dosiervorrichtung zugeführt. Die Stromversorgung geschieht durch einen stromstabilisierten Hochspannungsgleichrichter. Die Trennkammer ist zur Abführung der Joule'schen Wärme gekühlt.

II. Ergebnisse

- 1) Normalwerte und Ermittlung der Fehlerbreiten bei der Papier- und der Acetatfolienelektrophorese.

Für den Arzt stellt das Elektropherogramm der Serumproteine bei vielen Krankheiten ein wichtiges Hilfsmittel zur Diagnose und zur Überwachung der Therapie dar. Dazu ist allerdings Voraussetzung, daß er die Normalwerte der prozentualen Zusammensetzung der Serumproteine klinisch gesunder Versuchspersonen sowie deren physiologische Schwankungsbreiten kennt. Die zahlreichen veröffentlichten Angaben über Normalwerte der menschlichen Serumproteine weichen zum Teil sehr erheblich voneinander ab. Der Hauptgrund hierfür liegt vor allem in den verschiedenen angewendeten Untersuchungstechniken. Es dürfen daher jeweils nur solche Ergebnisse

miteinander verglichen werden, die mittels der gleichen Methode unter gleichen Versuchsbedingungen gewonnen wurden.

Über diese methodisch bedingten Abweichungen hinaus existieren jedoch auch echte physiologische Schwankungen der Serumproteinwerte normaler Versuchspersonen, die aus einer Reihe verschiedenster Faktoren, von denen einige erwähnt werden sollen, resultieren:

So zeigen die tabellarisch zusammengefaßten Versuchsergebnisse von Caspani (29) bzw. Rafski (30) eine Verschiebung des Serumeiweißbildes - Abnahme des Albuminanteils, Zunahme des Globulinanteils - mit steigendem Lebensalter.

T a b e l l e 2

Serumproteinverteilung in Abhängigkeit vom Lebensalter

	Alter	rel. Gew. %					Bestimmungs- zahl
		Albumin	Globuline				
			α_1	α_2	β	γ	
Caspani u. Mitar- beiter (29)	Nabelschnur- blut	63,4	4,4	6,5	8,8	16,9	13
	1-2 Wochen	55,2	5,3	11,9	11,6	16,0	7
	5-6 Wochen	57,8	5,8	11,8	10,9	13,7	9
	2-3 Jahre	63,4	3,4	8,0	13,5	11,7	8
Rafski u. Mitar- beiter (30)	3-8 Jahre	57,7	6,3	10,6	10,3	9,7	13
	9-16 Jahre	58,8	4,9	9,5	12,6	9,5	30
	19-25 Jahre	60,3	4,6	7,2	12,1	11,0	15
	18-55 Jahre	56,0	7,2	8,8	13,1	14,7	80
	65-95 Jahre	48,6	8,5	10,2	16,7	15,9	31

Edozien (31), der Sera von 50 gesunden Afrikanern und Europäern untersuchte, konnte rassisch bedingte Unterschiede im Serumeiweißbild feststellen.

T a b e l l e 3

Rassisch bedingte Unterschiede des Bluteiweißbildes (31)

	Relative Prozente				
	Albumine	Globuline			
		α_1	α_2	β	γ
Europäer	58,5	4,5	7,5	11,9	17,6
Nigerianer	49,5	2,9	7,5	9,4	31,3

Zu ähnlichen Ergebnissen war Le Gac (32) gelangt. Er verglich die Serumeiweißbilder von Europäern mit denen der Bewohner verschiedenster außereuropäischer Länder und stellte bei letzteren verminderten Albumin- und erhöhten γ -Globulin-gehalt fest, was er der unterschiedlichen Ernährung zuschreibt. Auch sollen - wenngleich minimale - tageszeitlich bedingte Schwankungen beobachtet worden sein.

a) Papierelektrophorese

Auch die papierelektrophoretisch ermittelten Normalwerte der Serumproteinzusammensetzung können wegen der oft recht unterschiedlich gehandhabten Technik in den einzelnen Laboratorien erheblich voneinander abweichen. Deshalb sind die in der Literatur veröffentlichten Normalwerte lediglich als orientierende Grundlage zu werten und es empfiehlt sich, daß jedes Laboratorium seine eigenen Normalwerte, sowie die Schwankungsbreiten unter streng standardisierten Versuchsbedingungen sozusagen für den Hausgebrauch selbst ermittelt. Weiterhin sollte jeder Untersucher eine Fehlerbreitenbestimmung zur Kontrolle seiner Arbeitsweise vornehmen. Dies habe ich an einem Normalserum (siehe Tab. 4) sowie an einem Lipoidnephroseserum (siehe Tab. 5) durchgeführt. Die Abb. 7

zeigt das Kurvendiagramm eines Normalserums, die Abb. 8 das eines Lipoidnephroseserums.

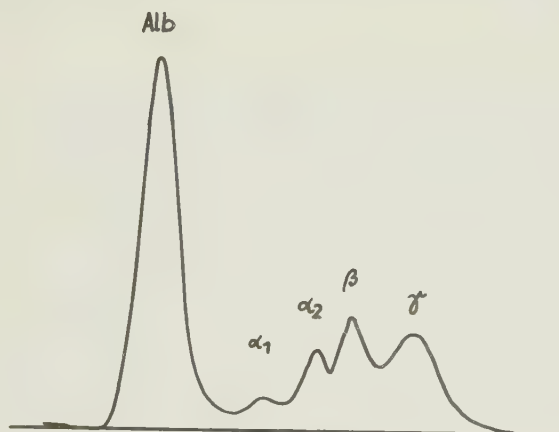


Abb. 7 Paperelektrophoresediagramm von Normalserum
(Veronalpuffer pH 8,6; 110 V; 16 Stunden)

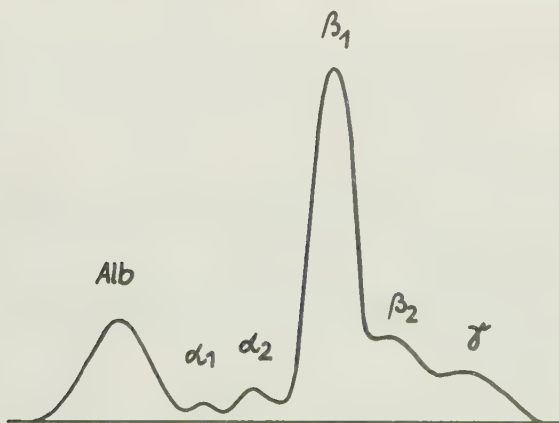


Abb. 8 Paperelektrophoresediagramm von Lipoidnephroseserum
(Veronalpuffer pH 8,6; 110 V; 16 Stunden)

T a b e l l e 4

Papierelektrophoretische 10-fach-Bestimmung der Serum-
proteinfraktionen eines Normalserums zur Ermittlung der
Fehlerbreiten.

Nr.	rel. Gew. %				
	Alb.	α_1 -Glob.	α_2 -Glob.	β -Glob.	γ -Glob.
1	57,0	4,0	7,9	11,0	20,1
2	55,0	5,0	7,2	11,5	21,3
3	56,8	3,8	6,2	12,1	21,1
4	53,9	5,4	8,7	11,9	19,1
5	55,3	4,0	8,0	11,6	21,1
6	58,0	3,6	6,9	11,7	19,8
7	54,2	4,7	7,6	12,2	21,3
8	55,6	4,3	6,8	12,6	20,7
9	54,9	3,9	7,3	10,3	23,6
10	53,8	5,5	8,2	10,1	22,4
Mittelwert	55,45	4,42	7,48	11,50	21,05

Die Berechnung des mittleren Fehlers (s) erfolgte nach der Formel

$$s = \sqrt{\frac{\sum x^2}{n-m}}$$

(wobei x die Abweichung vom Mittelwert, m die Zahl der untersuchten Sera bedeutet).

Die fehlerkritische Auswertung der durchgeführten Bestimmungen ist den von Hannig (23) ermittelten Werten in Tab. 6 gegenübergestellt.

T a b e l l e 5

Papierelektrophoretische 10-fach-Bestimmung der Serum-
proteinfraktionen eines Lipoidnephroseserums zur Ermittlung
der Fehlerbreiten.

Nr.	rel. Gew. %					
	Alb.	α_1 -Glob.	α_2 -Glob.	β_1 -Glob.	β_2 -Glob.	γ -Glob.
1	18,2	1,1	4,0	54,3	11,1	11,3
2	18,1	1,6	4,4	56,0	9,8	10,1
3	19,4	0,9	2,6	54,7	13,2	9,2
4	17,5	2,0	3,6	52,9	10,9	13,1
5	17,8	2,8	3,7	56,4	9,9	9,4
6	21,7	0,7	1,9	58,4	8,7	8,8
7	20,0	1,0	3,5	54,2	10,8	10,5
8	20,9	1,1	2,8	52,3	12,2	10,7
9	19,2	1,8	3,6	53,3	12,0	10,1
10	17,2	1,0	3,9	56,1	10,0	11,8
Mittelwert	19,0	1,4	3,4	54,8	10,9	10,5

T a b e l l e 6

Fehlerbreiten bei der Papierelektrophorese

	s		
	Normalserum (23)	Normalserum	Lipoidnephroseserum
Alb.	$\pm 1,2 \%$	$\pm 1,34 \%$	$\pm 1,43 \%$
α_1 -Glob.	$\pm 0,6 \%$	$\pm 0,65 \%$	$\pm 0,61 \%$
α_2 -Glob.	$\pm 0,7 \%$	$\pm 0,71 \%$	$\pm 0,71 \%$
β_1 -Glob.	$\pm 0,7 \%$	$\pm 0,77 \%$	$\pm 1,77 \%$
β_2 -Glob.			$\pm 1,27 \%$
γ -Glob.	$\pm 1,2 \%$	$\pm 1,22 \%$	$\pm 1,24 \%$

b) Acetatfolienelektrophorese

Die Fehlerbreitenermittlung wurde wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben vorgenommen. Es wurden insgesamt 50 Bestimmungen von 10 verschiedenen Normalsera durchgeführt. Die Ergebnisse der fehlerkritischen Auswertung sind in Tab. 7 zusammengefaßt.

T a b e l l e 7

Fehlerbreiten bei der Acetatfolienelektrophorese

	s
Alb.	$\pm 1,2 \%$
α_1 -Glob.	$\pm 0,5 \%$
α_2 -Glob.	$\pm 0,5 \%$
β -Glob.	$\pm 0,5 \%$
γ -Glob.	$\pm 1,0 \%$

Die Fehlerbreiten liegen durchwegs niedriger als bei der Papirelektrophorese, was auf die völlige Transparenz der zur Auswertung gelangenden Elektropherogramme zurückzuführen sein dürfte. Sonst zeigt diese Methode mit Ausnahme des noch geringeren Analysenmaterialverbrauches sowie der geringeren Laufzeit der Versuche der Papirelektrophorese gegenüber keine Vorteile. Die Auftrennung erfolgt ebenfalls nur in die bekannten 5 klassischen Proteinfractionen, die auch bei der Papirelektrophorese auftreten.

Auf eine quantitative Auswertung der mittels der Microzone-cell-Methode erhaltenen Membranfolienelektropherogramme wurde verzichtet, da sich, wie erwähnt, diese Methode mehr für visuelle Betrachtung anbietet und außerdem kein geeignetes hochwertiges Auswertgerät zur Verfügung stand. Aus ähnlichen Gründen wurde auch keine quantitative Auswertung und Ermittlung der Normalwerte der bei der Diskelektrophorese auftretenden Proteinbanden vorgenommen.

Wie später noch ausgeführt werden wird (vergl. Abschnitt II, 2 b)) liegt auch das Problem der Diskelektrophorese zumindest im Augenblick weniger in einer exakten quantitativen Aussage, als vielmehr in der sehr weitgehenden Auftrennung in über 20 Serumproteinfraktionen. Damit ergibt sich zunächst die Notwendigkeit der Charakterisierung und gegenseitigen Zuordnung dieser zahlreichen Proteinbanden, ähnlich wie dies auch bei den Präzipitationslinien in der Immunelektrophorese der Fall ist. Die photometrische Auswertung kann dabei als Hilfsmittel von Nutzen sein, um die Lage der mehr oder minder starken Banden exakt zu ermitteln und die Reproduzierbarkeit der Auftrennung zu überprüfen.

2) Zuordnung der diskelektrophoretisch aufgetrennten Serumproteinfraktionen zu den 5 "klassischen" Proteinfraktionen

a) Präparative Isolierung von Serumproteinfraktionen

Sowohl mittels der Diskelektrophorese als auch der Immunelektrophorese kann das Serumeiweiß in etwa 21 Fraktionen aufgetrennt werden.

Um diese Methoden für diagnostische Zwecke verwenden zu können, müssen die einzelnen Banden zunächst den 5 klassischen Serumproteinfraktionen zugeordnet werden. Am eindeutigsten muß dies gelingen, wenn die 5 isolierten "klassischen" Serumproteinfraktionen einzeln der Diskelektrophorese unterworfen werden.

Ich habe daher zunächst 2 ml eines Normalserums in der trägerfreien kontinuierlichen Elektrophoreseapparatur unter Verwendung von Trispuffer (pH 8,6) aufgetrennt (siehe exp. Teil).

Die Abb. 9 zeigt die durch Extinktionsmessung bei 280 m μ erhaltene Proteinverteilungskurve.

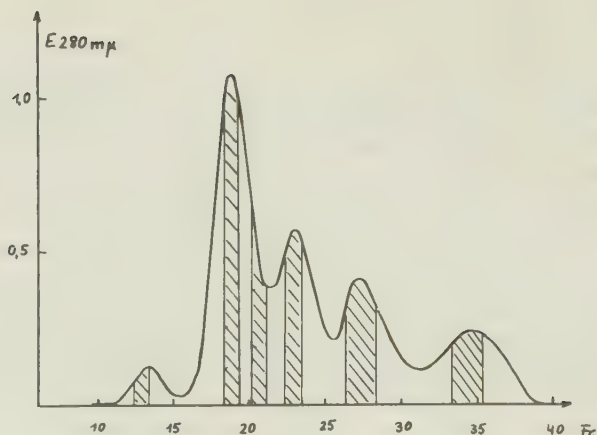


Abb. 9 Kurvendiagramm der präparativen Serumentrennung in der trägerfreien kontinuierlichen Elektrophorese-apparatur.

(Trispuffer pH 8,6; 2.300 V; 160 mA). Extinktionsmessung bei 280 mμ. = gesammelte Fraktionen

Entsprechend der Verteilungskurve (Abb. 9) wurden die Fraktionen 13 (Präalbumin), 19 (Albumin), 21 (α_1 -Globulin), 23 (α_2 -Globulin), 27 + 28 (β -Globulin) und 34 + 35 (γ -Globulin) in der in Abb. 10 dargestellten Apparatur einzeln eingengt.

Die zu konzentrierende Proteinlösung wird in die Kollodiumhülle gebracht. Wie aus der Skizze (Abb. 10) ersichtlich, ist der Absaugstutzen mit einer entsprechenden Pufferlösung (in unserem Falle; Trispuffer pH 8,6) gefüllt. Das an den Absaugstutzen angelegte Wasserstrahlvakuum bewirkt den Austritt von Flüssigkeit und niedermolekularen Stoffen aus der Kollodiumhülle, während Proteine zurückbleiben. Auf diese Weise findet eine rasche und äußerst schonende Konzentrierung der Proteinlösung statt. In der Kollodiumhülle bleibt die Konzentration der Puffersalze praktisch konstant, wodurch eine bei vielen anderen Konzentrierungsmethoden beobachtete Ausfällung von Proteinen vermieden wird. Zur Reinheitsprüfung wurden diese konzentrierten Fraktionen der Acetatfolienelektrophorese sowie der Immunelektrophorese (siehe Abb. 11a und b) unterworfen.

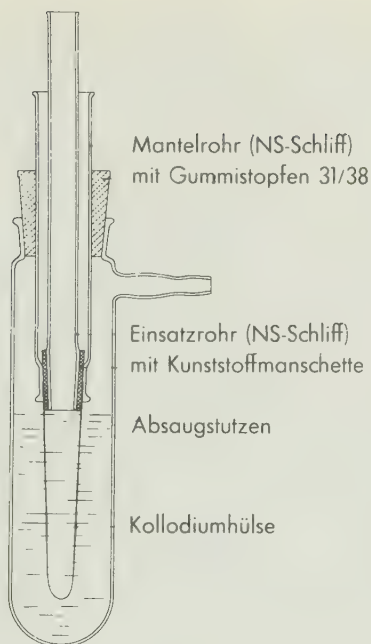


Abb. 10 Apparatur zur schonenden Einengung von Eiweiß-
lösungen.

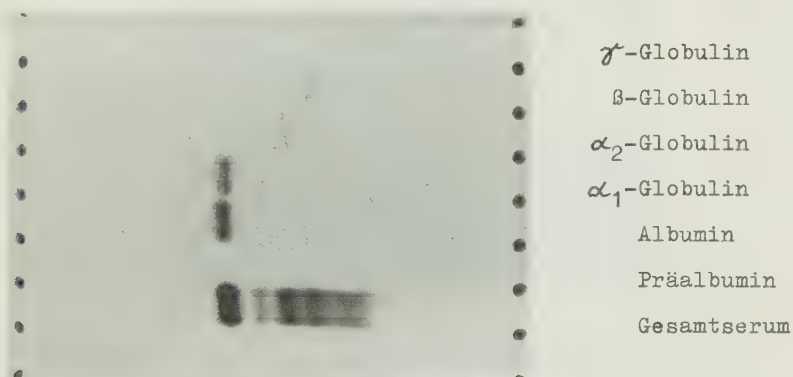


Abb. 11a Acetatfolienelektrophorese der präparativ ge-
trennten Serumproteinfraktionen.

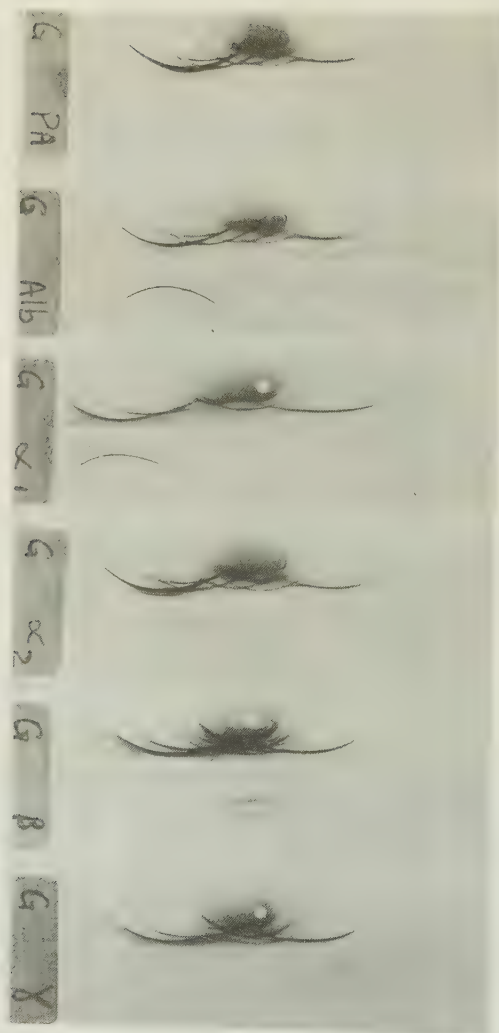


Abb. 11b Immunoelktrophorese der präparativ getrennten Serumproteinfraktionen.

Die Abb. 11a zeigt, daß sämtliche geprüften Fraktionen mit Ausnahme der noch relativ viel Albumin enthaltenden α_1 -Fraktion nach den Kriterien der Acetatfolienelektrophorese als rein zu bezeichnen sind.

Das gleiche Ergebnis liefert die immunoelktrophoretische

Reinheitsprüfung (Abb. 11b). Auch hieraus ist zu ersehen, daß die einzelnen geprüften Proteinfractionen - mit Ausnahme von Albumin und α_1 -Globulin - keine Anteile der Nachbarfractionen enthalten.

b) Auftrennung der präparativ gewonnenen Serumproteinfraktionen in der Diskelektrophorese

Die, wie in Abschnitt 2 a) beschrieben, isolierten Serumproteinfraktionen wurden nunmehr der Diskelektrophorese unterworfen. Gleichzeitig wurde auch das Gesamtserum, aus dem die Einzelfractionen gewonnen waren, aufgetrennt. Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abb. 12 zusammengefaßt. Abb. 13 zeigt die densitometrische Auswertung der Disk-elektropherogramme der einzelnen Serumproteinfraktionen.

Aus der Proteinverteilungskurve (Abb. 9) der präparativen Serumentrennung ist bereits ersichtlich, daß keine genügend scharfe Abtrennung des α_1 -Globulins vom Albumin stattgefunden hat, was hier deutlich sichtbar wird. Da hier jedoch speziell die Bereiche α_2 -, β - und γ -Globulin interessieren, wurde auf eine weitere Reinigung der Albumin- und der α_1 -Fraktion verzichtet. Wie erwartet, zeigen die Disk-elektropherogramme der mittels der trägerfreien Elektrophorese isolierten Proteinfraktionen, speziell die α_2 - und die β -Globulin-Fraktion eine weitere Auftrennung in Unterfraktionen. Bemerkenswert und überraschend jedoch ist die Tatsache, daß im Gegensatz zu Papier-, Acetatfolien-, Tiselius- und trägerfreier, kontinuierlicher Elektrophorese hier die α_2 -Banden eine geringere Wanderungsgeschwindigkeit besitzen als die β -Banden. Dieser Befund kann mit dem "Barriereffekt" von Bermes und McDonald (33), der von Größe und Gestalt der wandernden Teilchen abhängt, erklärt werden. Dieser in der Papierelektrophorese schwache Effekt ist in der Elektrophorese mit verschiedenen Gelen als Trägermaterial sehr viel stärker ausgeprägt. So kann z.B. eine Substanz, die in der Papier- oder der Tiseliuslektrophorese einheitlich wandert, bei der Elektrophorese in Agar-, Stärke- oder

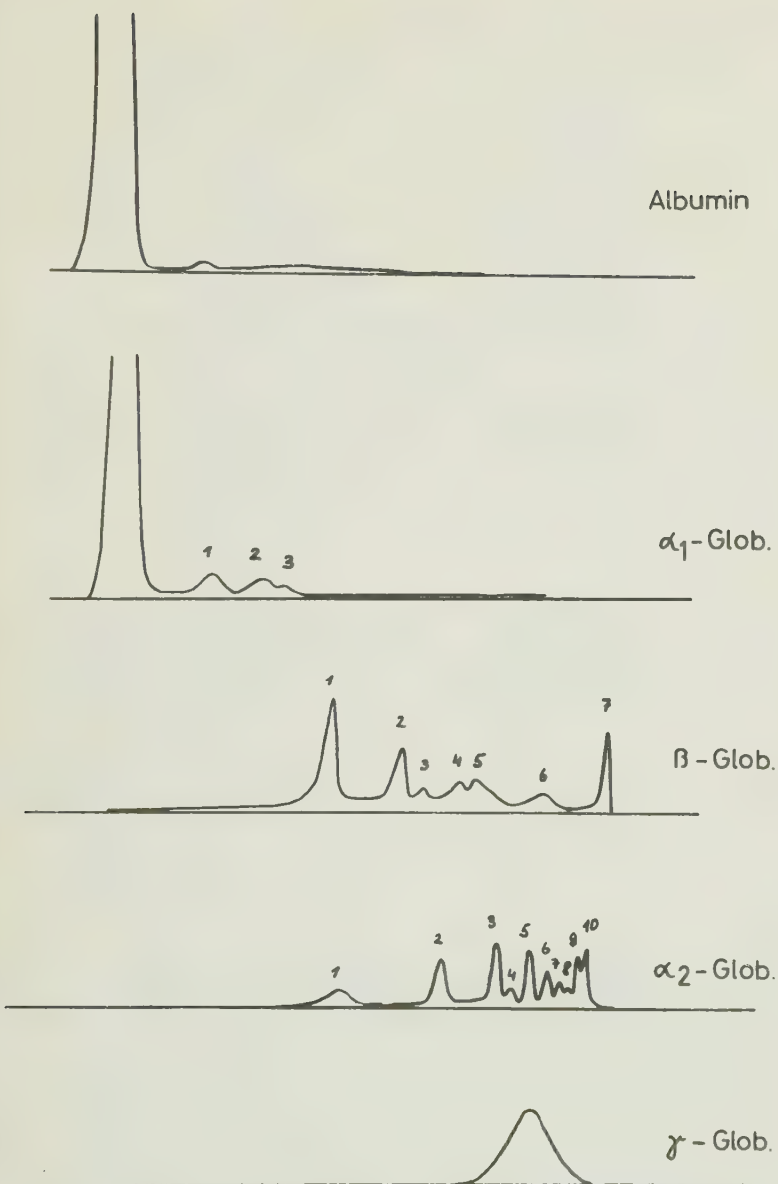


Abb. 13 Densitometrische Auswertung der Diskelektropherogramme der präparativ isolierten Serumproteinfraktionen (Filmpositiv-Verfahren).

Polyacrylamidgel mehrere Komponenten aufweisen, sofern in der Substanz Teilchen enthalten sind, die zwar gleiche Ladung besitzen, sich jedoch nach Molekülgröße, Form und Struktur unterscheiden. Diese auch als Siebeffekt bezeichnete Erscheinung kann sogar bewirken, daß Moleküle mit größerer elektrophoretischer Wanderungsgeschwindigkeit hinter Molekülen mit kleinerer elektrophoretischer Beweglichkeit zurückbleiben.

Durch diese Verschiebung der Wanderungsgeschwindigkeiten, wodurch in unserem Falle Überschneidungen der α_2 -Fraktionen mit β - und γ -Fraktionen auftreten, wird eine exakte quantitative Auswertung von Serum-Diskelektropherogrammen außerordentlich schwierig und die erhoffte Erweiterung der klinisch diagnostischen Aussagemöglichkeit der Diskelektrophorese zumindest bei dem heutigen Stand eingeschränkt.

Nach Abschluss meiner Versuche bekam ich Kenntnis von einer Arbeit von Clarke (34), der ebenfalls den Versuch machte, die bei der diskelektrophoretischen Auftrennung der Serumproteine auftretenden Banden den 5 klassischen Proteinfractionen zuzuordnen. Abb. 14 zeigt eine Gegenüberstellung der von Clarke und von uns durchgeführten Zuordnung. Unsere Ergebnisse stimmen im Präalbumin-, Albumin- und α_1 -Globulinbereich im wesentlichen überein. Während ich jedoch immer 6-7 β -Fraktionen fand, treten bei Clarke nur 2 β -Banden auf. Er gibt 16 α_2 -Fraktionen an, wobei in diesem Bereich keine β -Fraktion auftritt. Ich hatte jedoch festgestellt, daß sich der β - und der α_2 -Bereich überschneidet und konnte im allgemeinen neben 7 β -Banden 7 - 10 α_2 -Fraktionen finden. Bei einigen der von Clarke dem α_2 -Bereich zugeordneten Fraktionen muß es sich daher um β -Banden handeln. Eine weitere Diskrepanz liegt in unseren Befunden über γ -Globulin. Ich konnte in vielen Versuchen eindeutig feststellen, daß γ -Globulin keine scharfe Zone, sondern ein einziges diffuses Band mit deutlicher anodischer Wanderung von der Grenze upper - lower gel bis in den α_2 -Bereich hinein darstellt. Bei der scharfen Fraktion, die an der Grenze zwischen upper gel und lower gel zu finden ist und die von Clarke als γ bezeichnet wurde, handelt es sich, wie ich aufgrund der diskelektrophoretischen Auftrennung der präparativ gewonnenen Serumfraktionen eindeutig feststellen konnte, um ein β -Globulin. Dieser Befund wurde durch immunoelektrophoretische Ergebnisse bestätigt.

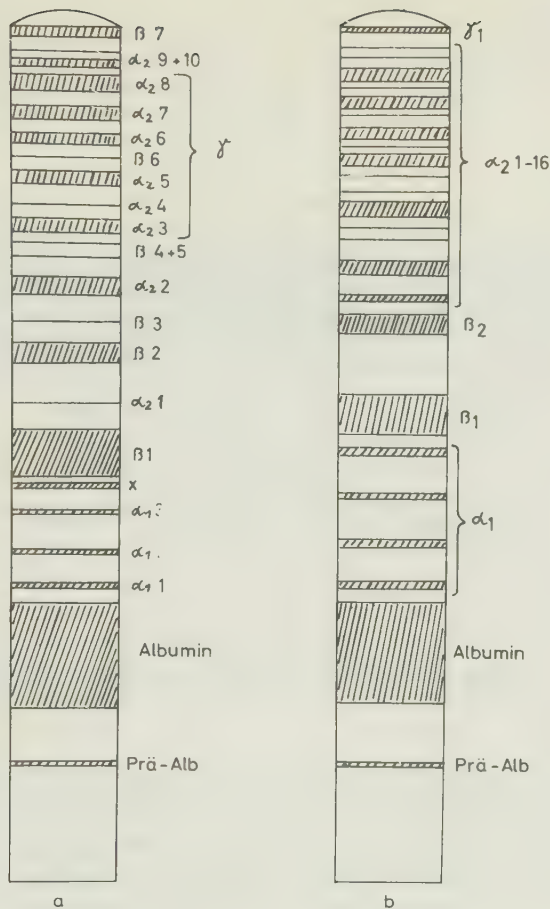


Abb. 14 Schematische Darstellung und Zuordnung der disk-
elektrophoretisch getrennten Serumproteinbanden.
a) eigene Ergebnisse; b) Zuordnung von Clarke (34)

c) Vergleich der diskelektrophoretischen Ergebnisse mit den
immunelektrophoretischen Ergebnissen von Grabar

Nach Grabar (35) (siehe Abb. 15) können 21 verschiedene
Proteine im Serum klinisch gesunder Versuchspersonen fest-
gestellt werden. Die gleiche Anzahl von Banden konnte ich

in der Regel bei der Diskelektrophorese feststellen (siehe Abb. 14).

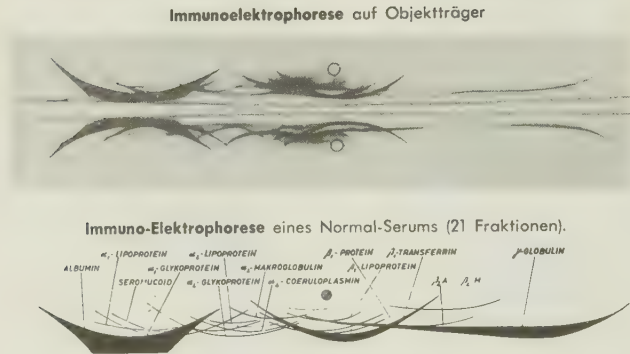


Abb. 15 Immunoelktrophoretische Serumproteintrennung (35)

Präalbumin:

Es sind 2 Präalbuminfraktionen (PA_1 , PA_2) bekannt, die in der Diskelektrophorese ebenfalls aufgefunden werden konnten. Der immunoelktrophoretische Nachweis in der präparativ isolierten Präalbuminfraktion gelang - offenbar wegen zu hoher Verdünnung des Materials - nicht. PA_2 ist ein Lipoprotein, dessen Beweglichkeit sich von Serum zu Serum unterscheiden kann.

Albumin:

Der Nachweis dieser stärksten Serumproteinfraktion gelingt immer. Der Präzipitationsbogen des Albumins ist wegen dessen hoher Konzentration ausgesprochen stark. Er zeigt manchmal Verzweigungen und kann sich im Antigenüberschuss auflösen. Diese Fraktion enthält auch Lipide, insbesondere Phospholipide.

α_1 -Globuline:

In der α_1 -Globulin-Region treten 3 Unterfraktionen auf, die ich ebenfalls sowohl immuno- als auch diskelektrophoretisch nachweisen konnte.

α_2 -Globuline:

Die α_2 -Globulin-Fraktion stellt mit ihren 7 von Grabar angegebenen Unterfraktionen die heterogenste Gruppe der Serumproteine dar. Zwei dieser Proteine sind als Lipoproteine erkannt worden und wandern in der Papierelektrophorese mit dem β -Globulin. Hierher gehört auch das Kupfer-bindende Protein Ceruloplasmin und das Haptoglobulin mit der niedrigsten Wanderungsgeschwindigkeit dieser Gruppe. Letzteres hat die Fähigkeit, mit Hämoglobin Komplexbindungen einzugehen.

Diskelektrophoretisch konnte ich 10 Banden in der präparativ isolierten α_2 -Globulin-Fraktion feststellen, mit Hilfe der Immunoelktrophorese allerdings nur 4. Nach Grabar liefert Pferde-Humanantiserum maximal 5 Präzipitationsbogen.

β -Globuline:

Die β_1 -Globulin-Zone zeigt gewöhnlich 3, mit manchen Immunsera 4 Banden. Nur die langsamste Komponente dieser Gruppe, das eisenhaltige Siderophilin, ist bisher identifiziert. Die Komponenten der β_2 -Globulin-Zone werden teilweise durch spezifische Präzipitate der γ -Globuline maskiert. Um sie nachzuweisen, müssen Immunsera verwendet werden, deren γ -Antikörper durch Adsorption an reines γ -Globulin eliminiert sind. Auf diese Weise können 2 Proteine aufgefunden werden: das β_2A , das im Serum Neugeborener und bei Agammaglobulinämie sowie bei manchen Myelom-Patienten fehlt, weiterhin das in Normalserum in äußerst geringer Konzentration vorhandene β_2M (β_2 -Makroglobulin). Bei Makroglobulinämie und verschiedenen Lebererkrankungen steigt jedoch der β_2M -Gehalt des Serums sehr erheblich an. Sowohl β_2A als auch β_2M erscheinen im Immuno-

elektropherogramm nicht als Bogen, sondern als flache Linien. Dies bedeutet, daß die Proteine entweder bei der elektrophoretischen Wanderung im Agar etwas gehemmt werden, oder daß es sich jeweils um mehrere Proteine mit wenig unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeit, jedoch mit gleicher Antigenspezifität handelt. In meiner diskelektrophoretischen Auftrennung der präparativ isolierten Gesamt- β -Globulin-Fraktion konnte ich 7 Banden feststellen, in der Immunoelktrophorese 4 Fraktionen.

γ -Globuline:

Die γ -Globuline bilden in der Immunoelktrophorese einen sehr langen relativ flachen Präzipitationsbogen, der von der Auftragstelle bis in die Zone der α_2 - bzw. β -Globuline hineinreicht. Es handelt sich um Unterfraktionen mit verschiedenen elektrophoretischen Beweglichkeiten, die jedoch die gleiche Antigenspezifität zu besitzen scheinen. Man spricht daher die γ -Globuline als Proteinfamilie an. Auch in der Diskelektrophorese erscheint γ -Globulin als diffuses breites Band.

Tab. 8 enthält eine Zusammenstellung der immunoelktrophoretischen Befunde von Grabar (35) und meiner diskelektrophoretischen Ergebnisse. Dazu ist zu bemerken, daß die für meine Untersuchungen präparativ gewonnenen Serumproteinfraktionen (Präalbumin, Albumin, α_1 -, α_2 -, β -, γ -Globulin) scharfe Ausschnitte der Gipfel der Verteilungskurve (Abb. 9) darstellten.

Es ist durchaus möglich, daß auf diese Weise zugunsten der erwünschten Reinheit die eine oder andere Unterfraktion weggeschnitten wurde und somit bei der Diskelektrophorese nicht mehr erfaßt werden konnte.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß sowohl die Immuno- als auch die Diskelektrophorese sehr leistungsfähige Methoden zur Trennung der Serumproteine darstellen. Mit der Immunoelktrophorese liegen heute wesentlich umfang-

T a b e l l e 8

Gegenüberstellung der diskelektrophoretischen Trennergebnisse und der Befunde von Grabar (35).

	Immunoelektrophorese (n. Grabar)	Diskelektrophorese
	Gesamtfaktionen etwa 21	Gesamtfaktionen etwa 21
Prä-Alb.	2 Fraktionen (u. Umständen 1 Fraktion)	2 Fraktionen (u. Umständen 1 Fraktion)
α_1 -Glob.	3 Fraktionen	3 Fraktionen
α_2 -Glob.	mindestens 7 Fraktionen	mindestens 7 Fraktionen
β -Glob.	ca. 6 Fraktionen	ca. 6 Fraktionen
γ -Glob.	1 lang ausgezogene Kette	1 diffuses breites Band

reichere Erfahrungen vor. Ihr diagnostischer Wert ist unbestritten. Sie erlaubt jedoch nur qualitative, bei außerordentlicher Übung und Erfahrung bestenfalls halb-quantitative Aussagen. Zudem hängt der Ausfall der Präzipitationsreaktion wesentlich von Art und Qualität des verwendeten Antiserums, d.h. von dessen Gehalt an Antikörpern ab. Sie wird also kaum für die routinemäßige klinische Diagnostik eingesetzt, sondern dient als Hilfsmittel zur Diagnose spezifischer Erkrankungen, z.B. Paraproteinämie, Makroglobulinämie.

Demgegenüber stellt die Diskelektrophorese eine rasch durchführbare und gut reproduzierbare, für klinische Routineuntersuchungen sicher geeignete Serum-Elektrophoresemethode dar. Die Methode ist allerdings diffiziler und deshalb stör anfälliger als die Papierelektrophorese und sie erfordert selbstverständlich einen größeren Arbeits- und Materialaufwand. Eine direkte densitometrische Auswertung der gefärbten Gelstäbchen ist bei Vorhandensein eines entsprechend leistungsfähigen Densitometers ohne weiteres möglich. Die quantitative Auswertung der Extinktionskurven stößt jedoch auf erhebliche Schwierigkeiten. Wie aus den Abbildungen zu ersehen ist, liegt die diffuse, breite γ -Globulin-Fraktion im α_2 -Bereich und bildet hier praktisch einen Untergrund

der scharfen α_2 -Banden. Im Diskelektropherogramm ist also nicht nur das γ -Globulin nicht erfaßbar, sondern es macht auch die quantitative Auswertung einiger α_2 -Fraktionen vorerst unmöglich. Eine weitere Schwierigkeit liegt in der exakten Zuordnung der zahlreichen Banden im α_2 - und β -Globulinbereich, zumal die Zahl der auftretenden Fraktionen von Fall zu Fall schwanken kann.

Es kann daher heute noch nicht vorausgesagt werden, welchen Platz die Diskelektrophorese im Rahmen der klinischen Diagnostik einmal einnehmen wird. Auf jeden Fall wird sie wie die Immunoelktrophorese zur Diagnose spezieller Erkrankungen herangezogen werden.

Der nun folgende Abschnitt der Arbeit stellt einen bescheidenen Versuch dar, eventuell vorhandene signifikante Unterschiede in den Serum-Diskelektropherogrammen bei verschiedenen Krankheitsbildern festzustellen.

3) Untersuchungen pathologisch veränderter Sera nach den beschriebenen Methoden (Beurteilung im Hinblick auf diagnostische Aussagen)

Nachdem nun die Leistungsfähigkeit der hier angewendeten Elektrophoresemethoden überprüft sowie ein Versuch der Zuordnung der zahlreichen in der Diskelektrophorese auftretenden Fraktionen durchgeführt worden war, waren die Voraussetzungen geschaffen, die Methoden zur klinisch diagnostischen Beurteilung einzusetzen. In der Hauptsache sollte die Frage geklärt werden, ob im Falle pathologischer Seren in der Diskelektrophorese zusätzliche, von der Norm abweichende Fraktionen auftreten, ob normal auftretende Fraktionen hier fehlen oder ob lediglich quantitative Unterschiede festzustellen sind.

Wie schon in Abschnitt I 3) erwähnt, habe ich die Auswertung der Diskelektropherogramme in Ermangelung eines entsprechenden Densitometers einerseits durch Direktphotometrie der Gelstäbchen, andererseits durch Photometrie der Filmpositivvergrößerungen vorgenommen. Letztere Methode liefert

zwar eine exaktere Wiedergabe der feinen Linien. Die Extinktionen entsprechen jedoch, wie schon ausgeführt, nicht mehr exakt den quantitativen Relationen. Speziell die Relationen zwischen der Fläche der Albuminfraktion und der Fläche der übrigen Fraktionen entsprechen nicht den exakten Konzentrationsrelationen.

Trotz all dieser Einschränkungen konnten - wie die im folgenden behandelten Ergebnisse zeigen - sogar schon aufgrund dieser primitiven Auswertung interessante Feststellungen gemacht werden.

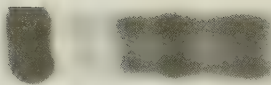
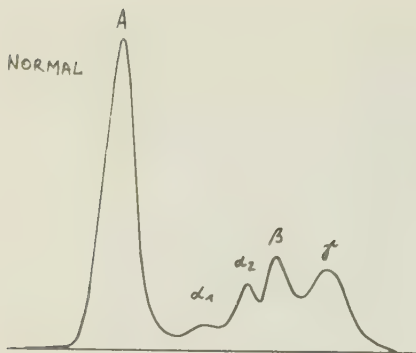
Von insgesamt 15 Sera der verschiedenen Konstellationstypen (1-8) sowie von 6 Normalsera wurden Papier-, Acetatfolien-, Immuno- und Diskelektrophoretische Mehrfachbestimmungen durchgeführt:

1. Rheumatica acuta (Typus der akuten Entzündung): 1 Patient
2. Pyelonephritis (Typus der subakut-chronischen Entzündung):
1 Patient
3. Hepatitis (Typus der Hepatitis): 3 Patienten
4. Lebercirrhose (Typus der Lebercirrhose): 2 Patienten
5. Lipoidnephrose (Typus des nephrotischen Symptomkomplexes):
5 Patienten
6. γ -Plasmocytom (Typus des γ -Plasmocytoms): 2 Patienten
7. β -Plasmocytom (Typus des β -Plasmocytoms): 1 Patient

Normalserum

Abb. 16 und Tab. 9 zeigen ein Beispiel der an Normalserum gewonnenen Ergebnisse. Alle untersuchten Normalsera zeigten das gleiche diskelektrophoretische Bild und eine fast identische Diskelektropherogrammkurve. Lediglich im Bereich α 2,5-10 konnte verschieden gute Auftrennung beobachtet werden.

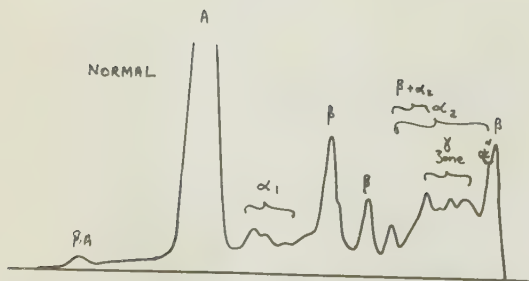
Die quantitativen papierelektrophoretischen Ergebnisse liegen im Bereich der Norm. Das Acetatfolienelektropherogramm wurde nicht quantitativ ausgewertet, es zeigte jedoch ebenfalls das erwartete normale Bild. Die Immunoelktrophorese ergab 20 Fraktionen. Die diskelektrophoretische Auftrennung



b



a



d

c

Abb. 16 Normalserum

a) Papierelektrophorese (Veronalpuffer pH 8,6; 110 V; 16 Stunden) b) Acetatfolienelektrophorese (Veronalpuffer pH 8,6; 250 V; 20 Min.) c) Diskelektrophorese (Tris-Glycinpuffer pH 8,3; 4 mA; 1 1/2 Stunden) d) Immunelektrophorese (Veronalpuffer pH 8,6; 5 mA; 2 Stunden)

von 0,005 ml Serum ergab bei diesem hier angeführten Normalserum insgesamt 23 visuell feststellbare Banden, wobei das breite diffuse γ -Globulin, wie schon erwähnt, nicht als selbständige Fraktion hervortritt. An Hand der vorgenommenen Zuordnung (siehe Abb. 12 und 13) konnte der 17 Fraktionen umfassende Bereich des α_2 - und des β -Globulins in je 10 α_2 -Fraktionen und 7 β -Fraktionen aufgeteilt werden. Einige dieser Banden liegen so nahe beieinander, daß sie im Auswertdiagramm nicht als gesonderte Peaks erscheinen, visuell jedoch einwandfrei festgestellt werden konnten.

T a b e l l e 9

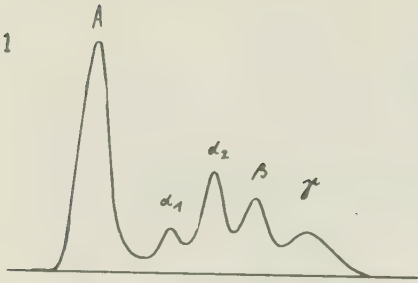
Ergebnisse der elektrophoretischen Trennungen eines Normalserums.

	Papierелеk- trophorese		Acetatfolien- elektroph.	Immunoelek- trophorese	Diskelektro- phorese
	Zahl d. Frakt.	rel %	Zahl d. Frakt.	Zahl d. Frakt.	Zahl d. Frakt.
Gesamt	5		6	20	23
Prä-Alb.	-	-	1	1	1
Albumin	1	57,0	1	1	1
α_1 -Glob.	1	4,3	1	3	3
α_2 -Glob.	1	6,4	1	14	10
β -Glob.	1	13,0	1		7
γ -Glob.	1	19,3	1		1

Typus der akuten Entzündung (Nr. 1)

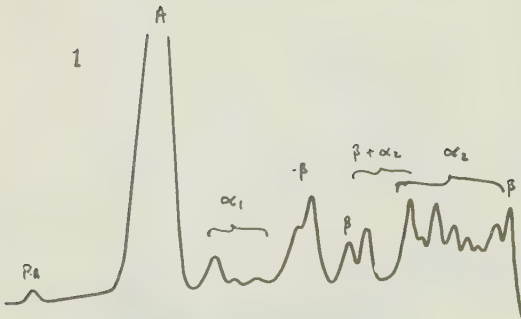
Anamnese des 57-jährigen Patienten:

Seit 6 Jahren ständig zunehmende Schmerzen in beiden Schultern und im Nackenbereich bis in das Hinterhauptgebiet ausstrahlend. Behandlung im Rheumakrankenhaus. 1966 erneutes Auftreten der Beschwerden. Resochinbehandlung erfolglos, daraufhin Corticoidtherapie. Bei der stationären Aufnahme Schmerzen in den Schultergelenken, beiden Händen und in den Kniegelenken. Alle Gelenke sind geschwollen. Die Schulter-Nacken-Muskulatur ist deutlich verspannt. Nach Angabe des Patienten sind die Gelenke wechselnd stärker befallen.



a

b



c

d

Abb. 17 Serum vom Typus der akuten Entzündung; chronische Polyarthrititis (Nr. 1)
(Versuchsdaten wie Abb. 16)

Diagnose: Akuter Schub einer chronischen Polyarthrititis.

Die Tab. 10 und die Abb. 17 zeigen das Ergebnis der elektrophoretischen Untersuchungen.

T a b e l l e 10

Ergebnisse der elektrophoretischen Serumuntersuchungen

(Typus der akuten Entzündung (Nr. 1))

	Papierelektrophorese		Acetatfolien- elektroph.	Immuno- elektrophorese	Diskelektrophorese
	Zahl d. Frakt.	rel %	Zahl d. Frakt.	Zahl d. Frakt.	Zahl d. Frakt.
Gesamt	5		6	15	26
Prä-Alb.	-	-	1	1	1
Albumin	1	47,2	1	1	1
α_1 -Glob.	1	6,1	1	3	3
α_2 -Glob.	1	18,3	1	9	10
β -Glob.	1	16,2	1		7
γ -Glob.	1	12,2	1		1
unbekannt	-	-	-	-	3

Die papierelektrophoretischen Proteinwerte mit dem niedrigen γ -Globulinanteil sind für den Typus der akuten Entzündung charakteristisch. Das Acetatfolienelektropherogramm zeigt das entsprechende Bild. Die diskelektrophoretische Auftrennung von 0,005 ml Serum zeigt gegenüber dem Normalserum folgende Besonderheiten: Das $\alpha_{1,1}$ ist auf Kosten von $\alpha_{1,2}$ und $\alpha_{1,3}$ erhöht, β_4 und β_5 sind ebenfalls stark erhöht. $\alpha_{2,2}$ ist enorm erniedrigt. Eindeutig erhöht erscheinen die übrigen α_2 -Komponenten, speziell die Fraktionen $\alpha_{2,3}$ und $\alpha_{2,5}$. Diese Erhöhung deckt sich mit dem papierelektrophoretischen Befund. 3 Banden konnten nicht zugeordnet werden.

Typus der subakut-chronischen Entzündung (Nr. 2)

Anamnese des 55-jährigen Patienten:

1942 Schlagverletzung der linken Niere, nach einigen Tagen Auftreten von Fieber, Schüttelfrost, stechenden Schmerzen in der Nierengegend, die bis in die Harnröhre ausstrahlten. In den folgenden Jahren Wiederholung der Beschwerden in 4 - 8-wöchigem Abstand. 1960 ständiger Brechreiz, Erbrechen, Appetitlosigkeit, Schwindelgefühl, Augenflimmern, starker Durst, Müdigkeit. 1962 Serum-Harnstoffwerte von 300 mg%; 1964 kolikartige, von der rechten Lendengegend in den Schoß ausstrahlende Schmerzen, Blut im Urin, Abgang von Blutkoagel, zurückgehende Harnausscheidung, Fieber, leichte Dehydration, klopfschmerzhaftes Nierenlager. R > L Makrohämaturie.

Diagnose: Chronische Pyelonephritis.

Tab. 11 und Abb. 18 zeigen das Ergebnis der elektrophoretischen Untersuchungen.

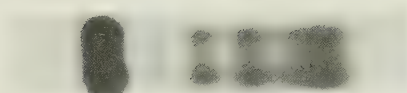
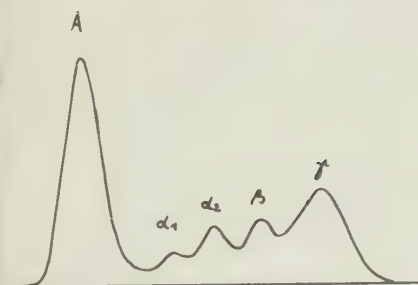
T a b e l l e 11

Ergebnisse der elektrophoretischen Serumuntersuchungen

(Typus der subakut-chronischen Entzündung (Nr. 2))

	Papierelektrophorese		Acetatfolien-	Immuno-	Diskelekt-
	Zahl d. Frakt.	rel %	elektroph.	trophorese	trophorese
			Zahl d. Frakt.	Zahl d. Frakt.	Zahl d. Frakt.
Gesamt	5		6	16	14
Prä-Alb.	-	-	1	1	1
Albumin	1	47,0	1	1	1
α_1 -Glob.	1	5,0	1	3	3
α_2 -Glob.	1	10,0	1	10	4
β -Glob.	1	11,0	1		4
γ -Glob.	1	27,0	1		1

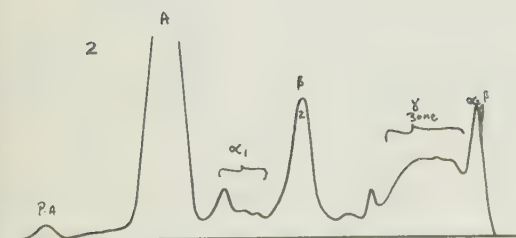
Die papierelektrophoretisch ermittelten Proteinwerte sind für den Typus der subakut-chronischen Entzündung charakteristisch. Die Gesamtzahl der Unterfraktionen sowohl in der Immuno- als auch in der Diskelektrophorese liegt mit 16 bzw.



b



a



d



c

Abb. 18 Serum vom Typus der subakut-chronischen Entzündung; chronische Pyelonephritis (Nr. 2)
(Versuchsdaten wie Abb. 16)

14 wesentlich unter der Norm. Die diskelektrophoretische Auftrennung von 0,005 ml Serum zeigt interessante Besonderheiten: Die $\alpha_{1,1}$ -Fraktion erscheint erhöht. Die β_2 -Fraktion ist sehr schwach. Die β_7 -Bande ist erhöht. $\alpha_{2,1}$ ist außerordentlich stark. Die übrigen Fraktionen des α_2 - und des β -Bereiches treten aus dem sehr starken diffusen Band des γ -Globulins nicht hervor und fehlen möglicherweise ganz. Bei diesem Krankheitsbild ist auch in der Diskelektrophorese eine erhebliche γ -Globulinvermehrung festzustellen.

Typus der Hepatitis (Nr. 3)

Es wurden 3 Hepatitis-Seren untersucht. Die Ergebnisse deckten sich mit Ausnahme geringer Schwankungen in der papier-elektrophoretischen Auswertung praktisch vollkommen. Deshalb soll hier nur ein Beispiel angeführt werden.

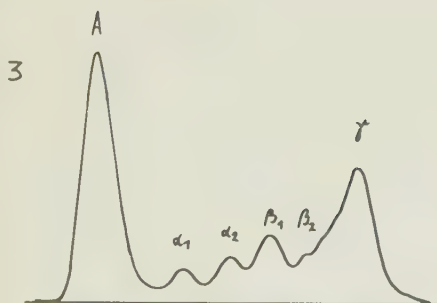
T a b e l l e 12

Ergebnisse der elektrophoretischen Serumuntersuchungen

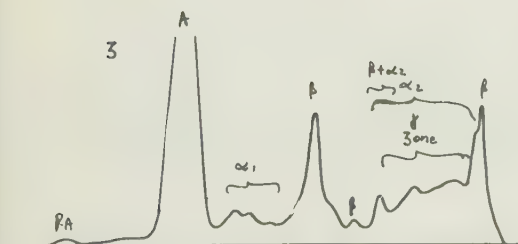
(Typus der Hepatitis (Nr. 3))

	Papiererek-trophorese		Acetatfolien-elektroph.	Immunoelek-trophorese	Diskelek-trophorese
	Zahl d. Frakt.	rel %	Zahl d. Frakt.	Zahl d. Frakt.	Zahl d. Frakt.
Gesamt	6		7	18	21
Prä-Alb.	-	-	1	1	1
Albumin	1	45,5	1	1	1
α_1 -Glob.	1	4,5	1	3	3
α_2 -Glob.	1	7,2	1	12	10
β -Glob. $\left\{ \begin{array}{l} \beta_1 \\ \beta_2 \end{array} \right.$	1	10,5	2		5
	1	5,4			
γ -Glob.	1	27,0	1	1	1

Typisch für das Serumeiweißbild bei Hepatitis (siehe Abb. 19; Tab. 12) ist eine Vermehrung des β -Globulins. Tritt außerdem noch eine Parenchym-Schädigung auf, so ist das γ -Globulin ebenfalls mehr oder minder stark vermehrt. Die hier festge-



a



c



d

Abb. 19 Serum vom Typus der Hepatitis (Nr. 3)
(Versuchsdaten wie Abb. 16)

stellten Werte von 15,9 rel % β -Globulin und 27 rel % γ -Globulin sprechen für eine Parenchym-Schädigung. Immunelektrophoretisch können 18, diskelektrophoretisch 21 Fraktionen festgestellt werden. Die Erhöhung des papier-elektrophoretisch ermittelten β -Globulin-Gehaltes tritt in der Diskelektrophorese wegen der Aufspaltung in 5 β -Fraktionen nicht deutlich hervor. Die β_2 -Fraktion ist deutlich vermindert. β_3 und β_6 fehlten im Diskelektropherogramm. β_4 und β_5 sind im Gelstäbchen visuell gut erfaßbar, erscheinen in dem Auswertdiagramm jedoch nur als Schulter. β_7 ist kaum erhöht. Die $\alpha_{2,1}$ -Fraktion tritt in gleicher Stärke auf wie im Normalserum, während $\alpha_{2,2}$ deutlich vermindert ist. Die Banden im α_2 - bzw. zum Teil im β -Bereich sind sehr schlecht zu erkennen, da hier das diffuse Band des vermehrten γ -Globulins dominiert. Auch in der Immunelektrophorese konnte eine beträchtliche γ -Globulin-Ver-mehrung festgestellt werden.

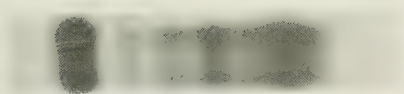
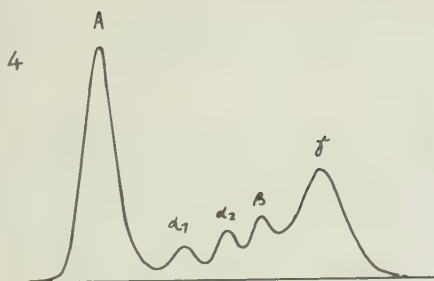
Typus der Lebercirrhose (Nr. 4)

Es wurden insgesamt 5 Sera von Lebercirrhose-Patienten untersucht. Die Ergebnisse zeigten sehr ähnliche Bilder. Es soll daher hier nur ein Beispiel angeführt werden. Anamnese:

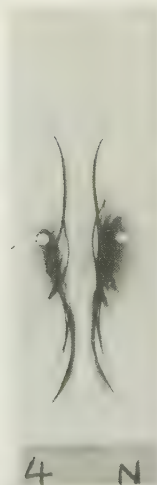
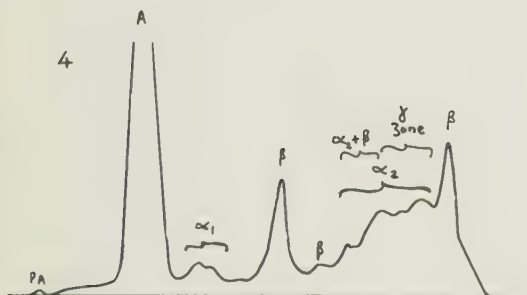
Der Patient hat uncharakteristische Oberbauchbeschwerden, morgens Haematemesis; beim Aufstehen starkes Schwindelgefühl; Zunahme des Leibesumfanges; kein Ikterus; kein auffälliger Stuhl; druckschmerzhaft, deutlich vergrößerte Leber; sichere Zeichen einer Ascites-Bildung; Milz unverändert. Leberfunktionsproben deuten auf Leberschaden.

Diagnose: Laparoskopisch und histologisch gesicherte, noch fortschreitende kleinknotige Lebercirrhose mit deutlicher Ascites-Bildung und erheblichen Ösophagusvarizen.

Die elektrophoretischen Ergebnisse sind in Abb. 20 und Tab. 13 zusammengefaßt.



a



d



Abb. 20 Serum vom Typus der Lebercirrhose (Nr. 4)
(Versuchsdaten wie Abb. 16)

Tabelle 13

Ergebnisse der elektrophoretischen Serumuntersuchungen (Typus der Lebercirrhose (Nr. 4))

	Papierелеktrophorese		Acetatfolien- elektroph.	Immunoелеktrophorese	Diskelektrophorese
	Zahl d. Frakt.	rel %	Zahl d. Frakt.	Zahl d. Frakt.	Zahl d. Frakt.
Gesamt	5		6	15	15
Prä-Alb.	-	-	1	1	1
Albumin	1	47,5	1	1	1
α_1 -Glob.	1	4,7	1	3	2
α_2 -Glob.	1	7,2	1		6
β -Glob.	1	8,6	1	9	4
γ -Glob.	1	32,0	1	1	1

Der papierелеktrophoretisch mit 32 % ermittelte γ -Globulinwert ist in Verbindung mit den Werten für die übrigen Proteinfraktionen charakteristisch für das Krankheitsbild der Lebercirrhose. Das Immunoелеktropherogramm weist 15 Fraktionen auf, wobei das γ -Globulin stark erhöht ist. Die Diskelektrophorese zeigt eine sehr schwache Präalbuminfraktion, neben dem normal erscheinenden Albumin (quantitative Aussagen sind hier allerdings nicht möglich) können 2

α_1 -Fraktionen von üblicher Konzentration festgestellt werden. Die β_2 -Fraktion ist deutlich vermindert. Das Diskurvendigramm zeigt im α_2 -Bereich nur schwach ausgeprägte Peaks, deren Anzahl gegenüber Normalserum reduziert erscheint. Auch bei visueller Betrachtung der Gelstäbchen konnten in diesem Bereich weniger und zum Teil schwächer ausgeprägte Banden als im Normalserum festgestellt werden. Es darf jedoch aufgrund der bisherigen Erfahrungen daraus nicht auf das völlige Fehlen solcher α_2 - bzw. β -Fraktionen im Lebercirrhoseserum geschlossen werden. Diese nicht nachweisbaren Banden könnten auch in niedriger Konzentration vorhanden, jedoch von dem starken γ -Globulinband verdeckt sein.

Typus des nephrotischen Symptomkomplexes (Nr. 5)

Es wurden die Sera von 2 Patienten untersucht

a) Anamnese des 4-jährigen Patienten:

Zunächst wurde ein Anschwellen der Augenpartie, später ein Anschwellen des Bauches und der Unterschenkel festgestellt. Es stellte sich ein ständiges Durstgefühl ein. Starke Müdigkeit, Erbrechen, Schläfrigkeit, Fieber, Husten, stark ödematös aufgeschwollenes Gesicht, Haut schwammig pastös, Tonsillen hyperplastisch ohne Belag, Rachenring gerötet.
Laborbefund: 625 mg % Cholesterin; 14,49 % Hb; 5,2 % Gesamteiweiß; 13,9 mg % Rest-N.

Diagnose: Lipoid-Nephrose

Das Ergebnis der elektrophoretischen Untersuchungen ist in Tab. 14 und Abb. 21 zusammengefaßt.

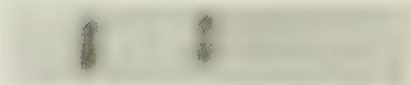
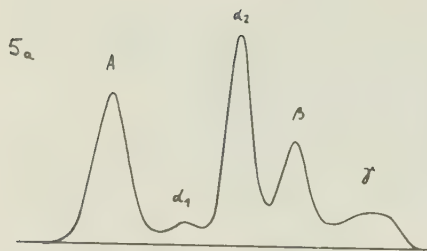
T a b e l l e 14

Ergebnisse der elektrophoretischen Serumuntersuchungen

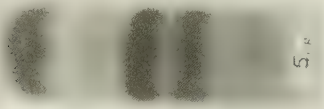
(Typus des nephrotischen Symptomkomplexes (Nr.5a))

	Papierелеk- trophorese		Acetatfolien- elektroph.	Immunoелеk- trophorese	Diskelek- trophorese
	Zahl d. Frakt.	rel %	Zahl d.Frakt.	Zahl d.Frakt.	Zahl d.Frakt.
Gesamt	5		6	17	26
Prä-Alb.	-	-	1	1	1
Albumin	1	31,4	1	1	1
α_1 -Glob.	1	5,1	1	2	3
α_2 -Glob.	1	33,4	1	12	12
β -Glob.	1	20,0	1		8
γ -Glob.	1	10,0	1		1

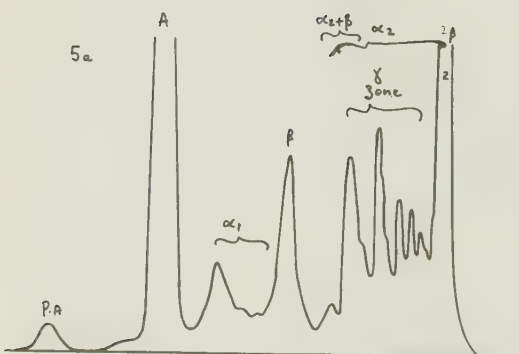
Die enorm auf Kosten des Albumins und des γ -Globulins erhöhten α_2 - und β -Globulinwerte bestätigen in Verbindung mit dem hohen Cholesterinspiegel das klinische Bild einer Lipoidnephrose. Das Albumin erscheint bei allen angewendeten Methoden stark erniedrigt, ebenso das γ -Globulin. Unter Be-



b



a



d



c

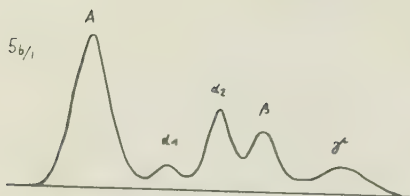
Abb. 21 Serum vom Typus des nephrotischen Symptomkomplexes;
Lipoidnephrose (Nr. 5a)
 (Versuchsdaten wie Abb. 16)

rücksichtigung der aufgetragenen Serummenge (0,015 ml) erschien sogar in der Diskelektrophorese das Albumin stark vermindert. Sowohl Gelstäbchen als auch Kurvendigramm zeigen 25 scharf ausgeprägte Banden bzw. Gipfel. Die $\alpha_{1,1}$ - und die $\alpha_{1,2}$ -Fraktion erscheint erhöht. Es wurden 10 α_2 -Banden, die gegenüber der Norm sämtlich erhöht sind, festgestellt, wobei die starke $\alpha_{2,2}$ -Fraktion in 2 Banden unterteilt ist. Besonders auffällig sind 2 sehr starke Fraktionen an der Kathodenseite (zwischen $\alpha_{2,10}$ und β_7), bei denen es sich entweder um Lipoproteine oder wahrscheinlicher um Makroglobuline handelt. Das β -Globulin wurde in 6 Unterfraktionen aufgetrennt. Die starke β_1 -Fraktion ist deutlich in 2 Banden unterteilt, die β_2 -Fraktion erscheint stark vermindert. Das β_7 -Lipoprotein ist in sehr hoher Konzentration vorhanden. Möglicherweise ist diese Fraktion jedoch von einem Paraprotein bzw. Makroglobulin überdeckt.

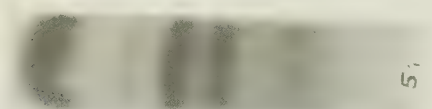
b) Ein zweiter Fall von Lipoid-Nephrose gelangte zur Untersuchung. Bei der Einlieferung der 8-jährigen Patientin in die Klinik wurde Serum und Harn entnommen und elektrophoretisch untersucht.

Tab. 15 und Abb. 22 zeigen die Versuchsergebnisse.

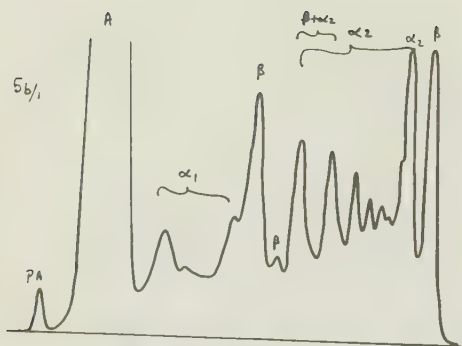
Die papierelektrophoretisch ermittelte Serumproteinverteilung zeigt - wenn auch nicht so deutlich wie im vorher besprochenen Falle - das für den nephrotischen Symptomkomplex charakteristische Bild. Das Diskelektropherogramm von 0,015 ml Serum zeigt 22 sehr scharfe Banden, die Gipfel des Diagramms sind dementsprechend hoch und schmal. Die Diskelektropherogramme der beiden Nephrose-Sera sind sich außerordentlich ähnlich und unterscheiden sich auf den ersten Blick grundlegend von denen aller anderen Sera. Man kann hier die Aufspaltung der β_2 -Fraktion in 3 enganeinanderliegende Banden feststellen. Die im ersten besprochenen Nephrose-Serum vorhandenen 2 sehr starken Fraktionen, bei



b



a



d



c

Abb. 22 Serum vom Typus des nephrotischen Symptomkomplexes;
Lipoidnephrose (Nr. 5b)
 (Versuchsdaten wie Abb. 16)

T a b e l l e 15

Ergebnisse der elektrophoretischen Serumuntersuchungen
(Typus des nephrotischen Symptomkomplexes (Nr. 5b))

	Papierelek- trophorese		Acetatfolien- elektroph.	Immunoelek- trophorese	Diskelek- trophorese
	Zahl d. Frakt.	rel %	Zahl d.Frakt.	Zahl d.Frakt.	Zahl d.Frakt.
Gesamt	5		6	12	22
Prä-Alb.	-	-	1	1	1
Albumin	1	48,0	1	1	1
α_1 -Glob.	1	6,4	1	3	2
α_2 -Glob.	1	18,6	1		11
β -Glob.	1	15,8	1	6	6
γ -Glob.	1	10,4	1	1	1

denen es sich um Makroglobuline handeln dürfte, sind hier
ebenso wie die β_7 -Fraktion auch sehr stark ausgeprägt.

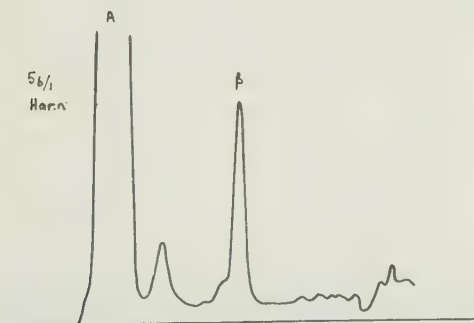


Abb. 23 Harn vom Typus des nephrotischen Symptomkomplexes;
Lipoidnephrose (Nr. 5b)
Diskelektrophorese (Tris-Glycinpuffer pH 8,3; 4 mA;
1 1/2 Stunden)

0,045 ml Harn der gleichen Patientin wurden ohne Vorbehandlung der Papier- und der Diskelektrophorese unterworfen (siehe Abb. 23). Neben viel Albumin erscheinen die $\alpha_{1,1}$ - und die β_1 -Bande, weiterhin eine sehr schwache, nicht identifizierte Fraktion (x). Die Relationen entsprechen in etwa denen im Serum. Völlig fehlen die übrigen β -, sämtliche α_2 - und die γ -Globulinfraktionen. Möglicherweise werden diese höhermolekularen Proteine in den Nierenglomeruli zurückgehalten.

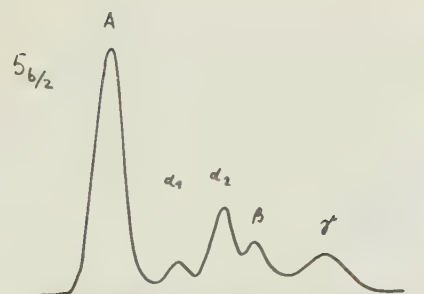
Nach 2-monatiger klinischer Behandlung wurde das Serum der Patientin erneut elektrophoretisch untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 24 und Tab. 16 zusammengefaßt.

T a b e l l e 16

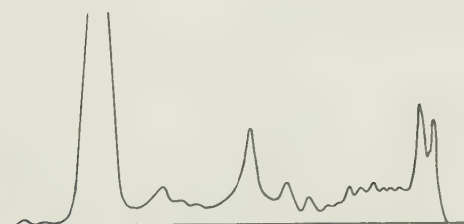
Ergebnisse der elektrophoretischen Serumuntersuchungen
(Typus des nephrotischen Symptomkomplexes (Nr. 5b nach
klinischer Behandlung))

	Papierelektrophorese		Diskelektrophorese	
	Zahl d. Frakt.	rel %	Zahl d. Frakt.	
Gesamt	5		26	
Prä-Alb.	-	-	1	
Albumin	1	54,5	1	
α_1 -Glob.	1	6,2	3	
α_2 -Glob.	1	17,4	11	
β -Glob.	1	9,4	8	
γ -Glob.	1	12,5	1	
unbekannt	-	-	1	

Die erneut durchgeführte Papierelektrophorese zeigt eine Normalisierungstendenz der Serumproteinwerte. Albumin und γ -Globulin hat zugenommen, der β -Globulingehalt ist über die Norm hinaus stark abgesunken, während die α_2 -Fraktion immer noch stark erhöht ist. Da bei den Diskelektrophoresen verschiedene Serummengen eingesetzt worden waren, können



a



b

Abb. 24 Serum vom Typus des nephrotischen Symptomkomplexes;
Lipoidnephrose nach klinischer Behandlung (Nr. 5b)
 a) Papierelektrophorese (Veronalpuffer pH 8,6; 110 V;
 16 Stunden) b) Diskelektrophorese (Tris-Glycinpuffer
 pH 8,3; 4 mA; 1 1/2 Stunden)

die beiden Diagramme (vor und nach Behandlung) nicht exakt miteinander verglichen werden. Die visuelle Abschätzung der Bandenintensitäten untereinander in den Gelstäbchen zeigt jedoch nach der Behandlung folgendes Bild: Die β_1 - und die β_2 -Fraktionen haben im Wesentlichen keine Veränderung erfahren, während alle anderen β -Fraktionen, insbesondere die ursprünglich sehr starke β_7 -Bande (Lipoprotein), wesentlich vermindert erscheinen. Die α_2 -Fraktionen scheinen ebenfalls abgenommen zu haben, während nach der papierelektrophoretischen Auswertung die Konzentration des α_2 -Anteils praktisch erhalten blieb. Das Diskelektropherogramm zeigt jedoch sehr eindeutig ebenso wie das Kurvendiagramm, daß die ohnehin sehr starke (α_2 -) Makroglobulin-Fraktion auf Kosten der übrigen α_2 -Banden zugenommen hat. Es sind also während der klinischen Behandlung innerhalb der α_2 -Fraktionen Konzentrationsverschiebungen eingetreten, jedoch dürfte keine Änderung im Gesamt- α_2 -Globulin-Gehalt des Serums stattgefunden haben.

Typus des γ -Plasmocytoms (Nr. 6)

Es gelangten 2 Fälle zur Untersuchung.

a) In Tab. 17 und Abb. 25 sind die Ergebnisse zusammengefaßt.

Papierelektrophoretisch ist eine enorme γ -Globulin-Ver-mehrung festzustellen, obwohl auffällt, daß die γ -Fraktion etwas in Richtung der β -Fraktion verschoben ist. Das Disk-elektropherogramm beweist jedoch, daß diese γ -Zunahme nur vorgetäuscht ist, denn nach dieser Methode ist das stets als breites diffuses Band auftretende γ -Globulin nicht sichtbar vermehrt. Eine starke γ -Zunahme könnte wie im vorher beschriebenen Falle der Lebercirrhose (siehe Abb. 20) dargestellt, eindeutig erfaßt werden. Die Immuno-elektrophorese zeigt hier ebenfalls keine γ -Globulin-Ver-mehrung an. Eine außerordentlich starke Diskbande tritt jedoch an der Grenze zwischen upper gel und lower gel im Bereich der β_7 -Fraktion auf. Diese starke Fraktion ist mit Sicherheit

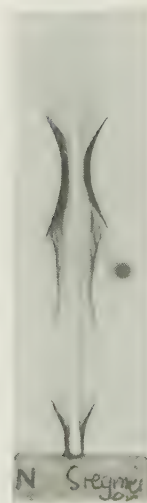
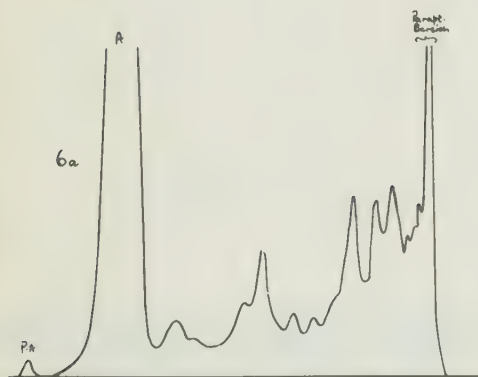
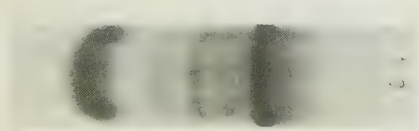
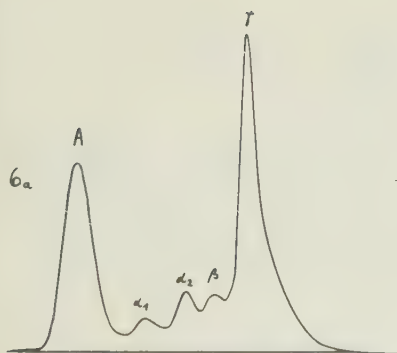


Abb. 25 ^c Serum vom Typus des -Plasmocytoms (Nr. 6a)
(Versuchsdaten wie Abb. 16)

Ergebnisse der elektrophoretischen Serumuntersuchungen

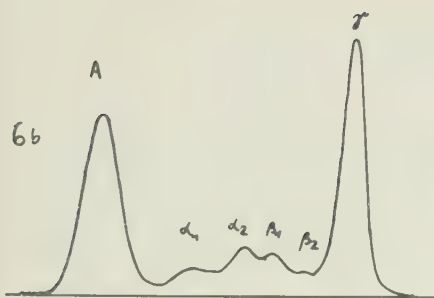
(Typus des γ -Plasmocytoms (Nr. 6a))

	Papiererek- trophorese		Acetatfolien- elektroph.	Immunoelek- trophorese	Diskelek- trophorese
	Zahl d. Frakt.	rel %	Zahl d.Frakt.	Zahl d.Frakt.	Zahl d.Frakt.
Gesamt	5		6	10	20
Prä-Alb.	-	-	1	1	1
Albumin	1	33,5	1	1	1
α_1 -Glob.	1	5,3	1	2	3
α_2 -Glob.	1	8,2	1	8	8
β -Glob.	1	7,5	1		5
γ -Glob.	1	45,5	1		1
Para- protein	-	-	-	-	1

verantwortlich für den in der Papierelektrophorese vorge-
täuschten hohen γ -Globulin-Wert. Ob es sich bei dieser
Fraktion um ein auf Kosten der verminderten β_1 - und β_2 -
Globuline sehr verstärktes β_7 -Globulin oder um ein pathologisch
gebildetes Makroglobulin handelt, kann aufgrund der Disk-
elektrophorese nicht entschieden werden.

b) In Tab. 18 und Abb. 26 sind die elektrophoretischen Er-
gebnisse des zweiten untersuchten γ -Plasmocytom-Serums
zusammengefaßt.

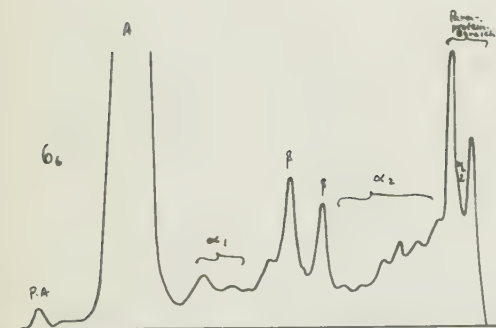
Die Papierelektrophorese zeigt 2 β -Fraktionen und neben
vermindertem Albumin stark vermehrtes γ -Globulin. Im Gegen-
satz zum vorher behandelten γ -Plasmocytom-Serum tritt
hier in der Immunoelektrophorese in der γ -Region ein ver-
breiteter Präzipitationsbogen auf, weiterhin ist ein
zweiter, im Normalserum fehlender Bogen, der für den Typus
des γ -Plasmocytoms charakteristisch sein soll, festzu-
stellen. Im Diskelektropherogramm tritt an der Stelle der
 $\alpha_{2,8}$ -Fraktion eine sehr starke Bande auf, die vornehmlich



b



a



c



N. Wilhelm

d

Abb. 26 Serum vom Typus des γ -Plasmocytoms (Nr. 6b)
(Versuchsdaten wie Abb. 16)

Ergebnisse der elektrophoretischen Serumuntersuchungen
(Typus des γ -Plasmocytoms (Nr. 6b))

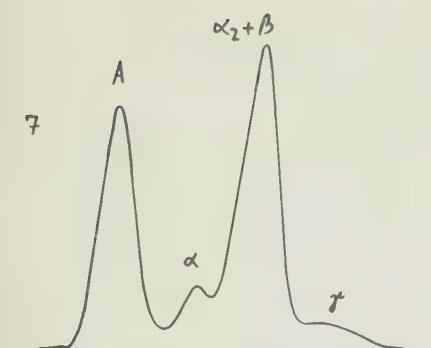
	Papiererek- trophorese		Acetatfolien- elektroph.	Immunoelek- trophorese	Diskelek- trophorese
	Zahl d. Frakt.	rel %	Zahl d.Frakt.	Zahl d.Frakt.	Zahl d.Frakt.
Gesamt	6		7	14	21
Prä-Alb.	1	-	1	1	1
Albumin	1	39,0	1	1	1
α_1 -Glob.	1	5,8	1	2	2
α_2 -Glob.	1	8,8	1	}	8
β -Glob.	2	{ 5,7 2,4	2		6
γ -Glob.	1	38,3	1	1	1
unbekannt	-	-	-	-	1
Para- protein (2,8)	-	-	-	-	1

verantwortlich sein dürfte für die papiererelektrophoretisch festgestellte γ -Globulin-Vermehrung. Es handelt sich höchstwahrscheinlich um ein für das Krankheitsbild charakteristisches Paraprotein. Die Diskelektrophorese zeigt keine Anhaltspunkte für eine echte γ -Globulin-Vermehrung.

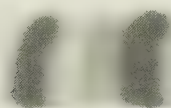
Wie aus den Abbildungen 25 und 26, insbesondere aus den Diskelektropherogrammen, eindeutig hervorgeht, handelt es sich bei den beiden hier diskutierten γ -Plasmocytomen um zwei völlig verschiedene Typen. Im Falle des γ -Plasmocytoms stellt also die Diskelektrophorese schon heute ein wertvolles diagnostisches Hilfsmittel dar.

Typus des β -Plasmocytoms (Nr. 7)

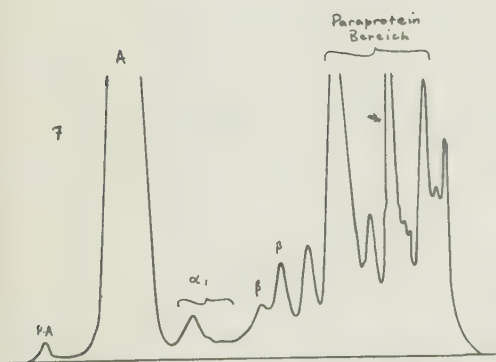
Die Tab. 19 und die Abb. 27 zeigen die elektrophoretischen Ergebnisse eines β -Plasmocytom-Serums.



b



a



N Siebert

d

Abb. 27 Serum vom Typus des B-Plasmocytoms (Nr. 7)
(Versuchsdaten wie Abb. 16)

T a b e l l e 19

Ergebnisse der elektrophoretischen Serumuntersuchungen
(Typus des β -Plasmocytoms (Nr. 7))

	Papierelek- trophorese	Acetatfolien- elektroph.	Immunoelek- trophorese	Diskelek- trophorese
	Zahl d. rel % Frakt.	Zahl d. Frakt.	Zahl d. Frakt.	Zahl d. Frakt.
Gesamt	4	5	11	20
Prä-Alb.	- -	1	1	1
Albumin	1 38,2	1	1	1
α_1 -Glob.	1 8,6	1	2	2
α_2 -Glob.	} 1 49,6	1	7	15
β -Glob.				
γ -Glob.	1 3,6	1	1	1

Die papierelektrophoretische Auftrennung zeigt nur 4 Fraktionen, wobei α_2 - und β -Globulin zusammen eine auf Kosten des Albumins und des γ -Globulins sehr verstärkte Fraktion ergeben.

Das Diskelektropherogramm zeigt im α_2 - und β -Bereich ein völlig abnormales Bild mit mehreren außerordentlich starken Banden, deren Zuordnung aufgrund unserer heutigen Erfahrungen sehr fragwürdig wäre. Vermutlich treten hier Paraproteine auf, die auch den hohen ($\alpha_2 + \beta$)-Gipfel in der Papierelektrophorese bilden

C. DISKUSSION

Ogbleich schon vor 3 Jahrzehnten von Tiselius die Bedeutung der elektrophoretischen Serumanalyse für die klinische Diagnostik erkannt worden war, hat erst viele Jahre später die mit geringem Aufwand durchführbare Papierelektrophorese als Routinemethode Eingang in das klinische Laboratorium gefunden. Dank dieser Technik mit der 5 Proteinfractionen (Albumin, α_1 -, α_2 -, β - und γ -Globulin) quantitativ erfaßt werden, konnten auf breiter Basis die Serumeiweißbilder bei den verschiedensten Krankheiten ermittelt werden. Die dabei festgestellten Proteinverschiebungen führten zu einer Einteilung in Konstellationstypen:

Typus der akuten Entzündung

Typus der subakut-chronischen und proliferativen Prozesse

Typus der Hepatitis

Typus der Lebercirrhose

Typus des Okklusionsikterus

Typus des nephrotischen Symptomkomplexes

Typus der malignen Tumoren

Typus des γ -Globulin-Plasmocytoms

Typus des β -Globulin-Plasmocytoms

Selbstverständlich sind der diagnostischen Aussagemöglichkeit der Papierelektrophorese Grenzen gesetzt. Nicht bei allen Krankheiten treten speziell charakteristische Veränderungen des Bluteiweißbildes auf. Auch können bei verschiedenen Erkrankungen ähnliche Eiweißbilder vorkommen. Selbst in solchen Fällen stellt jedoch die papierelektrophoretische Serumproteinanalyse in Verbindung mit anderen Untersuchungen bzw. mit dem klinischen Bild ein wertvolles diagnostisches Hilfsmittel dar. Auf jeden Fall werden durch sie die wesentlich ungenaueren Serumlabilitätsproben wie z.B. Takata-, Weltmann-, Cadmiumsulfat-Thymolreaktion überflüssig.

Da seit langem bekannt ist, daß im Serum weit mehr verschiedene Proteine auftreten als man papierelektrophoretisch

erfassen kann, wurden nun die größten Anstrengungen unternommen, die Methode zu verbessern, d.h. die Trennleistung zu erhöhen in der Hoffnung, bei einer größeren Anzahl quantitativ erfaßbarer Proteinfractionen spezielle diagnostische Aussagen machen zu können. Von all diesen mehr oder minder erfolgreichen Versuchen hat sich zunächst nur die Acetatfolienelektrophorese durchgesetzt. Mit dieser Methode sollen etwa 8 Proteinfractionen erhalten werden, in der Regel, speziell im Routinelabor, werden jedoch nur 6-7 verschiedene Fractionen festgestellt. Wegen dieser kaum besseren Trennleistung, die sich übrigens aus der Materialähnlichkeit von Papier und Acetatfolie erklärt, hat die Acetatfolienelektrophorese die Papierelektrophorese nicht verdrängen können. Ihre Vorteile gegenüber der Papierelektrophorese liegen lediglich in der sehr verkürzten Trenn- und Färbezeit, weshalb sie hauptsächlich da angewandt wird, wo ein rasches Ergebnis gewünscht wird.

Wie die von mir durchgeführten und mit der Literatur in Einklang stehenden Fehlerbreitenermittlungen (siehe S. 27,28) zeigen, liegen diese bei der Acetatfolie kaum niedriger als bei der Papierelektrophorese:
 Albumin: $\pm 1,2 \text{ \%} / \pm 1,34 \text{ \%}$; α_1 -Globulin: $\pm 0,5 \text{ \%} / \pm 0,65 \text{ \%}$;
 α_2 -Globulin: $\pm 0,55 \text{ \%} / \pm 0,71 \text{ \%}$; β -Globulin: $\pm 0,5 \text{ \%} / \pm 0,77 \text{ \%}$ und γ -Globulin: $\pm 1,0 \text{ \%} / \pm 1,22 \text{ \%}$.

Grabar sowie Williams begannen 1953 die Immunoelktrophorese zu entwickeln. Diese Methode, bei der als Trägermaterial Agargel- das an sich gegenüber den Serumproteinen kaum bessere Trenneigenschaften besitzt als Papier - dient, stellt eine Kombination von Elektrophorese und immunochemischem Untersuchungsverfahren dar. Mit dieser Methode können in Normalserum mindestens 18 (heute schon bis zu 30) verschiedene Serumproteine festgestellt werden. Während die Papier- sowie die Acetatfolienelektrophorese nahezu absolut reproduzierbare quantitative Werte liefern, ergeben sich bei der Immunoelktrophorese diesbezüglich erhebliche Schwierigkeiten. Der Ausfall der Präzipitationsreaktion hängt naturgemäß sowohl von der Konzentration des

Antigens (hier also der verschiedenen Serumproteinfraktionen), als auch von der Antikörperkonzentration ab. Proteine sind nun die besten und typischsten Antigene, unterscheiden sich aber in ihrer Antigen-Potenz zum Teil erheblich voneinander. Diese Unterschiedlichkeit verlangt daher besondere Maßnahmen bei der Herstellung der Immunsera, die ja möglichst Antikörper gegen alle nur möglichen Antigene (Proteine) enthalten sollen. Im Prinzip wird eine optimale Antikörperbildung durch Hyperimmunisierung der Tiere erreicht.

Eine weitere Schwierigkeit ist, daß die Antikörperbildung selbst unter genau gleichen Immunisierungsbedingungen sowohl in qualitativer als auch in quantitativer Hinsicht sehr großen Schwankungen unterworfen sein kann. So konnte Grabar (35) feststellen, daß von 20 unter völlig gleichen Bedingungen immunisierten Meerschweinchen zwei gar keine Antikörper gegen Albumin und γ -Globulin gebildet hatten, während das Serum der übrigen diese Antikörper enthielt. Es ist daher unumgänglich, jeweils eine größere Anzahl von Tieren zu immunisieren, den Antikörpergehalt der Sera zu kontrollieren und ein Gemisch aus den besten Antisera herzustellen, das dann für die Immunoelktrophorese verwendet werden kann. Trotz dieses großen Aufwandes gelingt es jedoch fast nie, ein Antiserum zu erhalten, das absolut spezifische Antikörper gegen alle in Frage kommenden Proteinfraktionen besitzt.

Antisera gegen γ -Globulinkomponenten (γ S7-Globulin, γ_1 A-Globulin und γ_1 M-Globulin) zeigen infolge immunologischer Verwandtschaft der Antigene Kreuzreaktionen. Anti- γ_1 A-Globulin-Serum kann Antikörper-Spuren gegen γ S7 und γ_1 M-Globulin aufweisen. Anti- γ_1 -Makroglobulin-Serum enthält manchmal noch Spuren von Antikörpern gegen γ S7-Globulin.

Auch weisen die Antisera von Tier zu Tier z.B. große qualitative Unterschiede auf. Z.B. lieferte Antihumanserum vom Kaninchen und Antihumanserum vom Pferd verschiedene Typen von Präzipitationslinien.

Eine weitere Schwierigkeit liegt in der Beurteilung der Präzipitationslinien. Regelmäßige mehr oder weniger elliptisch geschwungene Bögen lassen auf die Anwesenheit einer

homogenen Fraktion schließen, da Antigen und Antikörper gleichzeitig diffundierend sich auf einer solchen Linie treffen. Lang ausgezogene, flache Präzipitationsbögen - wie im Falle des γ -Globulin - weisen andererseits auf eine gewisse Heterogenität, sozusagen auf ein Gemisch eng verwandter Proteine hin.

Gelegentlich wird beobachtet, daß Präzipitationslinien verbreitert oder in Längsrichtung gespalten sind, wobei durch ein Antigen mehrere Antigene vorgetäuscht werden. Diese Erscheinung rührt von einem Antigen- oder auch Antikörperüberschuss her. Wandern dagegen zwei Antigene elektrophoretisch gleich, unterscheiden sich aber in ihren Diffusionsgeschwindigkeiten, so treten zwei parallele unter Umständen verschieden stark gekrümmte Präzipitationslinien auf. Gekreuzte Bögen weisen auf zwei Antigene hin (siehe Abb. 28).

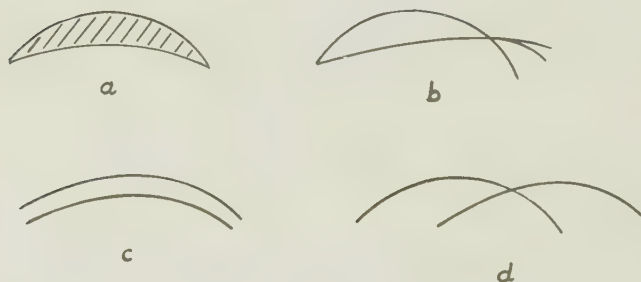


Abb. 28 Schematische Darstellung verschiedenartiger Präzipitationsbögen bei der Immunelektrophorese.
a) Verbreiterung; b) Aufspaltung; c) Parallele Präzipitationsbögen; d) gekreuzte Bögen

Alle diese hier nur kurz gestreiften Faktoren machen schon die qualitative Auswertung eines Immunelektropherogrammes außerordentlich schwierig und ohne besondere Erfahrung

sogar sehr fragwürdig. Es ist leicht einzusehen, daß eine exakte quantitative Aussage praktisch unmöglich ist. An Hand von vielen unter Variation des Serum-Antiserumverhältnisses durchgeführten Paralleluntersuchungen können bei viel Übung bestenfalls halbquantitative Schätzungen vorgenommen werden.

Aus diesen Gründen kann die Immunoelektrophorese die Papier- bzw. die Acetatfolienelektrophorese im klinischen Routine-laboratorium keinesfalls ersetzen oder verdrängen. Ihre Bedeutung für die Medizin liegt in der Forschung und in der Diagnosemöglichkeit bestimmter spezifischer Erkrankungen. So kann aufgrund der papierelektrophoretischen Serum-analyse z.B. ein Plasmocytom wohl vermutet werden, zur Sicherung der Diagnose muß jedoch die Immunoelektrophorese unter Verwendung spezifischer Antisera herangezogen werden. Während sich Anti- γ -Globulin-Serum und Anti- γ_1 A-Globulin-Serum für den Nachweis von Plasmocytom-Proteinen eignen, lassen sich mit Anti- γ_1 -Makroglobulin-Serum Makroglobuline im Serum von Patienten mit Makroglobulinämie Waldenström charakterisieren.

Die im Rahmen dieser Arbeit unter Verwendung von Gesamt-Antihumanserum (Pferd) hergestellten Immunoelektropherogramme an 6 Normal- und 15 pathologischen Sera zeigten fast identische Bilder, obwohl Sera der verschiedensten Konstellationstypen untersucht worden waren (siehe Abb. 16-27). Lediglich im Falle des γ -Plasmocytoms (6b) konnte sowohl eine Verbreiterung der γ -Präzipitationsbande als auch das Auftreten einer zweiten γ -Linie beobachtet werden. Das zweite untersuchte γ -Plasmocytom-Serum (6a) zeigte diese Besonderheiten nicht, was mit den später diskutierten diskelektrophoretischen Ergebnissen in Einklang steht. Ein entscheidender Fortschritt hinsichtlich Trennleistung konnte mit Stärkegel (Smithies (17)) bzw. Acrylamidgel (Raymond und Weintraub (21)) als Elektrophoreseträger erzielt werden. Bei der Verwendung von Gelen tritt nämlich neben dem eigentlichen elektrophoretischen Trenneffekt ein zusätzlicher Trenneffekt, der als sogenannter Siebeffekt bezeichnet wird, auf. Der Wanderung von Molekülen wird je

nach Größe und Gestalt ein mehr oder weniger großer, von der Porenweite des Gels abhängiger Widerstand entgegengesetzt. So können z.B. relativ kleine Moleküle, die im Gel nicht oder kaum gebremst werden, mit verhältnismäßig geringer elektrophoretischer Wanderungsgeschwindigkeit trotzdem rascher wandern als stärker geladene jedoch große Moleküle. Moleküle mit gleicher Ladung, also gleicher elektrophoretischer Wanderungsgeschwindigkeit, die jedoch unterschiedliche Größe bzw. Gestalt besitzen, können im Gel somit aufgrund des Siebeffektes verschieden rasch wandern, wodurch ein zusätzlicher Trenneffekt erreicht wird.

Das Polyacrylamidgel besitzt im Gegensatz zu Stärke und Agar sehr wesentliche Eigenschaften: Chemische Stabilität und Indifferenz, keine Adsorptions- und Osmoseeffekte, Unlöslichkeit in den meisten Lösungsmitteln, Analysenreinheit der Ausgangsstoffe, Stabilität gegenüber pH- und Temperaturänderungen. Die Dichte des Gel-Gitters, somit die Porengröße ist abhängig vom Polymerisationsgrad und somit nach Wunsch - in gewissen Grenzen - variierbar. Es wurde z.B. berechnet, daß 30 %ige Gele einen durchschnittlichen Porendurchmesser von 20 Å besitzen, während 7,5 %ige Gele eine Porengröße von 50 Å aufweisen, also in der Größenordnung von Eiweißkörpern liegen (siehe Tab. 20).

Die Variierbarkeit der Porengröße des Polyacrylamidgels erlaubt eine gezielte Steuerung des gewünschten Siebeffektes. Ornstein und Davis (22a) haben 1959 die Acrylamidgelelektrophorese in Form der sogenannten Diskelektrophorese zu einer interessanten und besonders leistungsfähigen Trennmethode, die inzwischen Eingang in zahlreiche Forschungslaboratorien gefunden hat, ausgebaut. Damit kann das Serumeiweiß in bis zu 30 Fraktionen aufgetrennt werden. Bei der Diskelektrophorese tritt jedoch im Gegensatz zur normalen Polyacrylamidgelelektrophorese innerhalb bzw. an der Grenze des großporigen upper gel ein Konzentrierungseffekt auf, der durch eine pH-Differenz zwischen upper gel und lower gel erreicht wird. Beim Eintritt in das Trenngel

Molekulargewichte und Größen einiger Serumproteinmoleküle (36)

Protein	Molekulargewicht $\cdot 10^{-3}$	Moleküllänge (Å)	Moleküldurchmesser (Å)
Albumin	69	150	38
Transferrin	90	190	37
β_1 -Lipoprotein	1300	185	185
γ -Globulin	156	235	44
Fibrinogen	400	700	38
α_2 -Makroglobulin	850	-	-

liegen dann die Proteine in Mikron-dünnen Scheibchen entsprechend ihren elektrophoretischen Beweglichkeiten geordnet hintereinander. Im Trenngel bewegen sich dann die Proteine bei einheitlicher Feldstärke und einem zur Trennung geeigneten pH-Wert, wobei der elektrophoretische Trenneffekt durch den schon erwähnten Molekularsiebeffekt verstärkt wird. Die Methode hat allgemein in der Eiweißanalytik Eingang gefunden und gewinnt auch zunehmende Bedeutung bei der Analyse der Serumproteine. Es fehlen allerdings bisher noch Erfahrungen hinsichtlich der Zuordnung der zahlreichen auftretenden Proteinbanden zu den 5 klassischen Serumproteinfraktionen. Weiterhin liegen hinsichtlich Normalwerten sowie pathologischen Veränderungen der einzelnen Serumproteinfraktionen noch zu wenig Erfahrungen vor, um die Methode jetzt schon routinemäßig anwenden zu können.

Eines der Ziele der vorliegenden Arbeit war, diese Zuordnung vorzunehmen.

Dazu wurden die Proteine eines Normalserums in der trägerfreien kontinuierlich arbeitenden Elektrophoreseapparatur isoliert (siehe S. 29). Nachdem eine Reinheitsprüfung dieser Einzelfractionen mittels der Immuno- und der Acetatfolienelektrophorese (siehe S. 31) durchgeführt worden war, wurden

diese der Diskelektrophorese unterworfen (siehe S. 33). Im selben Ansatz wurde auch das Normalserum, aus dem die Einzelfraktionen gewonnen worden waren, diskelektrophoretisch untersucht. Wie aufgrund des Siebeffektes zu erwarten, wanderten fast alle α_2 -Banden langsamer als die in 6-7 Fraktionen aufgetrennten β -Globuline. Die in diesen Bereichen auftretenden Überschneidungen erschweren - zumal die einzelnen Fraktionen z.T. sehr nah beieinander liegen und teilweise sehr schwach sind - eine quantitative Auswertung der Diskelektropherogramme. Dazu kommt noch, daß das γ -Globulin nicht als scharfe Fraktion, sondern als diffuses, breites Band im Bereich der α_2 -Globuline erscheint. Da mir während der Durchführung dieser Versuche keine Arbeiten, die sich mit den Zuordnungsproblemen befassen, bekannt waren, nahm ich eine willkürliche Nummerierung der Unterfraktionen ($\alpha_{1,1} - \alpha_{1,3}$; $\alpha_{2,1} - \alpha_{2,10}$ und $\beta_1 - \beta_7$) vor (siehe Abb. 12 und 13).

Inzwischen wurde uns eine Arbeit von Clarke zugänglich, in der ebenfalls eine Zuordnung der im Diskelektropherogramm auftretenden Serumproteinbanden vorgenommen wurden (vergl. Abb. 14). Diese Ergebnisse stimmen mit den unseren im α_2 -, β - und γ -Globulinbereich nicht überein. Während Clarke nur 2 β -Banden angibt, konnte ich an Hand der Diskelektropherogramme der in der trägerfreien Elektrophoreseapparatur isolierten β -Fraktion jeweils 6-7 Unterfraktionen (β_{1-7}) feststellen. Bei einigen seiner 16 α_2 -Banden (wir hatten meist 7-10 α_2 -Fraktionen festgestellt) handelt es sich somit sicher um β -Globuline. Während weiterhin in unseren Versuchen, wie schon erwähnt, das γ -Globulin als breites Band im α_2 -Bereich erscheint, sieht Clarke in der von uns mit β_7 bezeichneten scharfen Fraktion, die an der Grenze zwischen upper gel und lower gel auftritt, das γ -Globulin. Ich möchte mir kein Urteil über die Clarke'schen Bezeichnungen anmaßen, glaube jedoch, daß meine Zuordnung der Unterfraktionen zu den klassischen Serumproteinfraktionen den Gegebenheiten entspricht, da sie an Hand der Diskelektropherogramme der in der trägerfreien Elektrophoreseapparatur präparativ isolierten Serumproteine (Präalbumin, Albumin, α_1 -, α_2 -, β - und γ -Globulin) durchgeführt wurde.

Nachdem nun ein Bezeichnungsschema für die Diskbanden - eine der Voraussetzungen für die Beurteilung pathologischer Sera - geschaffen war, versuchte ich, eine quantitative Auswertung

der Diskelektropherogramme vorzunehmen (siehe S. 17). Erst damit war die Möglichkeit gegeben, nicht nur qualitative (Fehlen oder zusätzliches Auftreten von Proteinfractionen) Unterschiede zu erfassen, sondern auch quantitative Abweichungen von der Norm zu registrieren. Die Proteinbanden und die Zwischenabstände sind mitunter nur 50 μ dick. Um bei einer densitometrischen Direktmessung der Gelstäbchen so feine Banden registrieren zu können, ist ein Gerät mit entsprechend schmalen Spalt und hoher Lichtintensität nötig, das uns nicht zur Verfügung stand. Ich habe trotzdem versucht, die in einer flachen Kuvette platt gedrückten Gelstäbchen direkt zu photometrieren. Infolge der viel zu großen, durch die Verstärkerleistung des Gerätes gegebene Spaltbreite wurden sehr nahaneinanderliegende Banden nicht aufgelöst. Deshalb versuchte ich, die Auswertung durch Photometrie von Filmpositivvergrößerungen der Gelstäbchen vorzunehmen. Mir ist bewußt, daß diese Auswertmethode eine Ungenauigkeit birgt, da die photographische Schicht nicht im Stande ist, allzu große Helligkeitsunterschiede zu verarbeiten. Die sehr dichten Fraktionen des Stäbchens (z.B. Albumin, unter Umständen β_7 -Globulin) erscheinen daher auf dem Filmpositiv heller, als es der Färbung im Stäbchen entspricht. Starke Proteinbanden ergeben dann bei der densitometrischen Messung zu niedrige Extinktionen. In Kenntnis dieser Schwierigkeiten wurde die Aufnahmetechnik so gut als möglich standardisiert, um so zu vergleichbaren Densitometerkurven zu gelangen, wenngleich die Höhe der einzelnen Peaks bei den starken Fraktionen nicht absolut der Proteinkonzentration entspricht. Die Nachteile bei der Auswertung der Filmpositive werden aufgewogen durch den Vorteil, durch entsprechende Vergrößerung auch die feinen Linien densitometrisch erfassen zu können.

Eine Prozentberechnung für die einzelnen Fraktionen des Diskelektropherogrammes wie sie bei der papierelektrophoretischen Auswertung durchgeführt wird, ist aber trotz der geleisteten Vorarbeiten schwer durchführbar, da einerseits die Gauß'schen Kurven bei so schmalen Fraktionen schwer

einzuzeichnen sind, andererseits - wie schon erwähnt - bei der hier vorgenommenen densitometrischen Messung der Filmpositivvergrößerung die sehr starken Fraktionen nicht völlig erfaßt werden. Dazu kommt noch, daß das im α_2 -Bereich als diffuses Band liegende γ -Globulin überhaupt nicht erfaßt, bestenfalls geschätzt werden kann. Ich habe mich daher in dieser ersten orientierenden Arbeit darauf beschränkt, die Kurvenbilder der verschiedenen pathologischen Sera untereinander und mit dem Bild des Normalserum zu vergleichen. Die Reproduzierbarkeit der Methode wurde an Hand von jeweils durchgeführten Mehrfachbestimmungen bewiesen. Das gleiche Serum ergab stets identische Auftrennungen und identische Kurvenbilder. Verschiedene Normalsera zeigten bis auf kleine, nur in der Gipfelhöhe zum Ausdruck kommende geringe Abweichungen ebenfalls identische Bilder. Mit diesen methodischen Voraussetzungen und Erfahrungen war es nun möglich, pathologische Sera zu untersuchen im Hinblick auf signifikante Abweichungen vom Normalserum, die über die Grenzen der Papierelektrophorese hinaus diagnostische Aussagen zulassen würden.

Es wurden 15 Sera verschiedener Konstellationstypen mit den folgenden Methoden untersucht und die Ergebnisse gegenübergestellt: Papierelektrophorese, Acetatfolienelektrophorese, Immunoelktrophorese und Diskelktrophorese (siehe Abschnitt B II 3), S. 42). Hinsichtlich letzterer Methode liegen so gut wie gar keine Erfahrungen mit pathologischen Sera vor. Die Trennung von β -Plasmocytom-Serum (siehe Abb. 27) ergibt ein von allen anderen Sera völlig verschiedenes, abnormales Bild. Es treten hier eine Reihe außerordentlich starker Banden auf, deren Zuordnung zu den Fraktionen des Normalserums nicht gelingt. Vermutlich handelt es sich dabei um mehrere Paraproteine, die auch für den bei der Papierelektrophorese auftretenden hohen ($\alpha_2 + \beta$)-Gipfel verantwortlich sind.

Die Diskfraktionen in den übrigen untersuchten Sera sind verschieden scharf ausgeprägt, die Bilder zeigen jedoch ziemliche Ähnlichkeit. Während bei der akuten Entzündung

(Abb. 17) und Lipoidnephrose (Abb. 21,22) exakte Banden auftreten, ist das Bild bei subakut-chronischer Entzündung (Abb. 18), Hepatitis (Abb. 19) auch bei Lebercirrhose (Abb. 20) speziell im γ -Bereich verwaschen, so daß hier kaum Einzelbanden zu erkennen sind. Soweit möglich, wurde die Zuordnung durchgeführt und die quantitativen Verhältnisse abgeschätzt.

Bei akuter Entzündung, bei subakut-chronischer Entzündung und bei Lipoidnephrose erscheint die $\alpha_{1,1}$ -Fraktion - meist auf Kosten von $\alpha_{1,2}$ und $\alpha_{1,3}$ - erhöht.

In den meisten der pathologischen Sera (z.B. bei subakut-chronischer Entzündung, Hepatitis, Lebercirrhose, Lipoidnephrose, γ -Plasmocytom) erscheint die β_2 -Fraktion vermindert. Während in dem einen Lipoidnephrose-Serum (Nr. 5a; Abb. 21) die β_2 -Fraktion ebenfalls erniedrigt ist, erscheint das β_2 im anderen Nephrose-Fall (Nr. 5b; Abb. 22) stark vermehrt und in 3 Banden unterteilt. Dieser Befund ist interessant, wenngleich auch aufgrund dieses einen Beispiels keine diagnostische Behauptung aufgestellt werden darf.

Beide Lipoidnephrose-Sera zeigen eine sehr starke β_7 -Bande, die nach klinischer Behandlung erheblich abgenommen hat. Ob es sich hier um echte β_7 -Vermehrung handelt, oder ob ein pathologisches Makroglobulin von gleicher Wanderung vorliegt, kann nicht entschieden werden. Weiterhin treten hier im Bereich zwischen β_7 und $\alpha_{2,10}$ zwei sehr starke Banden auf, bei denen es sich um Lipoproteine oder wahrscheinlicher um Makroglobuline handeln dürfte.

Im γ -Plasmocytom-Serum (Nr. 6a; Abb. 25) tritt ebenfalls die starke β_7 - (oder Makroglobulin-) Bande auf. Diese Bande ist im anderen γ -Plasmocytom-Serum (Nr. 6b; Abb. 26) wohl ebenfalls, aber in viel geringerer Konzentration enthalten. Dafür tritt hier (etwa im Bereich von $\alpha_{2,8}$) eine sehr starke Bande, vermutlich ein Paraprotein, auf. Diese Makroglobulin- bzw. Paraproteinbanden müssen für die papierelektrophoretisch festgestellte γ -Vermehrung verantwortlich sein. Daß es sich um keine echte γ -Vermehrung handelt, zeigt auch die Immunoelktrophorese.

Das diskelektrophoretische Bild dürfte die Aussage erlauben, daß es sich bei den beiden hier besprochenen γ -Plasmocytom-Fällen um zwei verschiedene Krankheitsbilder handelt.

Die Elektropherogramme der verschiedenen pathologischen Sera zeigen noch weitere Abweichungen bzw. Besonderheiten, z.B. die stark vermehrte, gespaltene β_1 -Fraktion bei subakut-chronischer Entzündung und - in geringerem Maße - bei Lipoidnephrose.

Soweit aufgrund dieser ersten spärlichen Ergebnisse eine Beurteilung der Diskelektrophorese im Hinblick auf ihre klinische Bedeutung vorgenommen werden kann, möchte ich folgendes bemerken: Die Diskelektrophorese stellt wie auch die Immunoelktrophorese eine sehr leistungsfähige Methode dar. Sobald Erfahrungen auf breiterer Basis vorliegen werden, wird ihre diagnostische Aussagemöglichkeit die der Papierelektrophorese in vielen Fällen sicher übertreffen. Die Methode ist allerdings diffiziler als die Papierelektrophorese, sie erfordert größeren Arbeitsaufwand. Gegenüber der Immunoelktrophorese bietet sie den Vorteil einer quantitativen Erfassung der Fraktionen und besserer Reproduzierbarkeit, da sie nicht wie die Immunoelktrophorese von biologischen Zufällen abhängt.

D. EXPERIMENTELLER TEIL

1) Papierelektrophorese

Pufferlösung:

29,43 g Veronalnatrium, 19,43 g Natriumacetat $\cdot$ 3 H₂O, 180 ml n/10 HCl werden auf 3 l aufgefüllt. Die Lösung hat pH 8,6 und eine Ionenstärke von 0,1.

Färbelösung:

Mischung aus 90 Vol Methanol + 10 Vol Eisessig (v/v), gesättigt mit Amidoschwarz 10 B, filtriert.

Entfärbelösung:

Mischung aus 90 Vol Methanol + 10 Vol Eisessig (v/v).

Transparenzöl:

Mischung aus α -Bromnaphthalin und Paraffinöl; Brechungsindex: 1,51

Papier:

Schleicher & Schüll 2043 a

2) Acetatfolienelektrophorese

a) Anordnung von Hannig

Pufferlösung:

14,72 g Veronalnatrium, 9,72 g Natriumacetat $\cdot$ 3 H₂O, 90 ml n/10 HCl werden auf 3 l aufgefüllt. Die Lösung hat pH 8,6; die Ionenstärke ist 0,05.

Färbelösung:

Mischung aus 90 % Methanol + 10 % Eisessig (v/v), Zusatz von 0,5 % Amidoschwarz 10 B.

Entfärbelösung: .

Mischung aus 90 % Methanol + 10 % Eisessig (v/v). Spezial-Transparenzöl für Membranfolien (Bender & Hobein)

b) Microzone Electrophoresis Cell (Beckman)

Es wurden durchwegs die Originallösungen von Beckman verwendet.

Pufferlösung:

Veronal-Puffer pH 8,6, Ionenstärke 0,075

Färbelösung:

0,2 g Ponceau S + 3,0 g Trichloressigsäure + 3,0 g Sulfo-salizylsäure mit dest. H_2O auf 100 ml aufgefüllt.

Entfärbelösung:

5 ml Eisessig mit dest. H_2O auf 100 ml aufgefüllt

Zwischenbad:

96 % Äthanol

Clearing-Lösung:

25 Vol Eisessig + 75 Vol Äthanol (96 %)

3) Diskelektrophorese

Die Aufbewahrung von Acrylamid und Methylenbisacrylamid und deren wässrigen Lösungen soll am besten lichtgeschützt und bei einer Temperatur von $4^{\circ}C$ erfolgen. Bei Alterung wässriger Acrylamidlösungen nimmt der pH-Wert infolge Hydrolyse zu, was eine Änderung der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit verursacht.

Stammlösungen:

Sämtliche Lösungen werden mit bidestilliertem Wasser hergestellt und nach eventueller Filtration im Kühlschrank aufbewahrt. Vor der Verwendung müssen die Stammlösungen auf Raumtemperatur gebracht sein.

A) 48,0 ml 1n HCl + 36,6 g Tris + 0,23 ml Tetramethyldiamin + H_2O ad 100 ml (pH 8,8 - 9,0)

B) 25,6 ml 1 m H_3PO_4 + 5,7 g Tris + H_2O ad 100 ml (pH 6,6 - 6,8)

C) 28,0 g Acrylamid + 0,735 g N,N'-Methylenbisacrylamid (monomer) + H_2O ad 100 ml

D) 10,0 g Acrylamid + 2,5 g N,N'-Methylenbisacrylamid (monomer) + H_2O ad 100 ml

E) 4 mg Riboflavin + H_2O ad 100 ml

F) 40 g Saccharose + H_2O ad 100 ml

Puffer:

6,0 g Tris + 28,8 g Glycin + H_2O ad 1000 ml (pH 8,3). Zur Elektrophorese ist der Puffer 1:10 zu verdünnen.

Die Bereitung der Gele erfolgt unmittelbar vor dem Gebrauch.

Lower gel:

- 1) 1 Vol A + 2 Vol C + 1 Vol H₂O (mit 1n HCl auf pH 8,9 einstellen)
 - 2) 0,14 g Ammoniumpersulfat/100 ml H₂O (im Kühlschrank bis zu einer Woche haltbar).
- Lösung 1 und 2 werden im Verhältnis 1:1 gemischt.

Upper gel:

1 Vol B + 2 Vol D + 1 Vol E + 4 Vol F + 1 Vol H₂O

Sample gel:

0,003 ml Serum + 0,15 ml upper gel + 1 Tropfen Sucroslösung

Färbelösung:

1,0 g Amidoschwarz 10 B + 7 % Essigsäure ad 100 ml. Die Lösung muß filtriert werden.

Entfärbelösung:

7 % Essigsäure

4) Immunelektrophorese

Pufferlösung:

29,43 g Veronalnatrium + 19,43 g Natriumacetat . 3 H₂O + 180 ml n/10 HCl mit bidestilliertem H₂O auf 3 l aufgefüllt. Die Lösung hat pH 8,6 und Ionenstärke 0,1.

Agar-Bereitung:

3 g Rein-Agar (Behring) läßt man in 100 ml H₂O quellen, dann wird bis zur Auflösung im Wasserbad erhitzt. Anschließend werden 100 ml der zur elektrophoretischen Trennung verwendeten Pufferlösung zugefügt und wenn nötig heiß filtriert.

Wird die fertige Agarlösung nicht gleich verbraucht, so kann sie in 10 ml-Portionen in Reagenzgläser abgefüllt und unter Zusatz von 1 Tropfen Natriummerthiolatlösung verschlossen im Kühlraum aufbewahrt werden. Vor Gebrauch wird der Agar im Wasserbad verflüssigt. Mehrmaliges Erhitzen ist zu vermeiden, da es zu Veränderung des Gels führen kann, was die elektrophoretische Trennung beeinflussen würde.

Färbelösung:

0,1 % Amidoschwarz 10 B in 10 % Essigsäure

Entfärbelösung:

1 % Essigsäure

5) Trägerfreie kontinuierliche Elektrophorese

Elektrodenpuffer:

29,1 g Tris/l (vor dem Auffüllen wird mit 2 m Citronensäure auf pH 8,6 eingestellt).

Spez. Leitfähigkeit: $0,00425 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

Kammerpuffer:

9,7 g Tris/l (vor dem Auffüllen wird mit 2 m Citronensäure auf pH 8,6 eingestellt).

Spez. Leitfähigkeit: $0,0016 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

Spannung: 2.300 Volt

Stromstärke: 160 mA

Temperatur: + 6° C

Substanz: 1 Vol Serum + 3 Vol Kammerpuffer

Pufferdosierung: 114 ml/Stunde

Substanzdosierung: 1,5 ml verdünntes Serum/Stunde.

E. ZUSAMMENFASSUNG

- 1) Es wurde die Leistungsfähigkeit und Reproduzierbarkeit folgender analytischer Elektrophoresemethoden überprüft und miteinander verglichen: Papier-, Acetatfolien-, Disk-, Immunoelektrophorese.
- 2) Weiterhin wurden Fehlerbreitenbestimmungen für die Papier- sowie die Acetatfolienelektrophorese durchgeführt.
- 3) Um eine Zuordnung der zahlreichen im Diskelektropherogramm auftretenden Serumproteinbanden zu den 5 klassischen Serumproteinfraktionen vornehmen zu können, wurden die Serumproteine in der trägerfreien kontinuierlich arbeitenden Elektrophoreseapparatur präparativ aufgetrennt und die 5 Einzelfractionen diskelektrophoretisch untersucht. Es wurde eine Nummerierung der Unterfraktionen ($\alpha_{1,1-3}$; $\alpha_{2,1-10}$; β_{1-7}) vorgenommen. Aufgrund dieser Versuche konnte die Lage und Reihenfolge der 20-26 im Diskelektropherogramm von Gesamtserum auftretenden Proteinbanden ermittelt werden.
- 4) Sera der verschiedenen Konstellationstypen wurden diskelektrophoretisch untersucht, um zu prüfen, ob die Diskelektrophorese weitgehendere diagnostische Aussagen erlaubt.
Obgleich eine eindeutige Beurteilung der Diskelektrophorese hinsichtlich ihrer Verwendungsfähigkeit im klinischen Routinelaboratorium aufgrund der geringen Anzahl der untersuchten Fälle verfrüht wäre, konnten jedoch bereits einige interessante Beobachtungen gemacht werden, z.B.: Verminderung der β_2 -Bande in den meisten der pathologischen Sera; unterschiedliches Bild bei den beiden Nephrose-Sera und bei den γ -Plasmocytomsera, was eventuell Differentialdiagnosen ermöglichen könnte; Auftreten starker Paraproteinbanden bei β -Plasmocytom. Um jedoch die in

pathologischen Sera festgestellten Veränderungen von Bandenintensitäten für diagnostische Zwecke verwerten zu können, müßten allerdings zunächst diskelektrophoretische Untersuchungen auf breitester Basis durchgeführt werden.

F. LITERATUR

- 1) L. Michaelis:
Biochem. Z. 16, 81 (1909)
- 2) A. Tiselius:
Trans. Faraday Soc. 33, 524 (1937)
- 3) W. Graßmann u. K. Hannig:
Naturwiss. 37, 496 (1950)
- 4) K. Hannig:
"Papierelektrophorese in der Eiweißchemie" in
Hoppe-Seyler/Thierfelder: Handbuch d. physiol.- u.
pathol.-chem. Analyse, IV, 10. Aufl. 136 (1960)
- 5) a) Th. Wieland u. F. Fischer:
Naturwiss. 35, 29 (1948)
b) F. Turba u. Erenkel:
Naturwiss. 37, 93 (1950)
c) W. Graßmann, K. Hannig u. M. Knedel:
Deutsche medizinische Wochenschrift 76, 333 (1951)
- 6) F. Wuhrmann u. Ch. Wunderly:
Die Bluteiweißkörper des Menschen. (Benno Schwabe & Co.,
Basel/Stuttgart 1957, 3. Aufl.)
- 7) G. Riva:
Das Serumeiweißbild. (Hans Huber, Bern/Stuttgart 1957)
- 8) A. Dittmer:
Papierelektrophorese (Gustav Fischer, Jena 1956)
- 9) Ch. Wunderly:
Die Papierelektrophorese. (H.R. Sauerländer & Co.,
Aarau/Frankfurt a.M. 1959, 2. Aufl.)
- 10) a) H. Bennhold:
Klin. Wochenschr. 31, 388 (1953)
b) H. Bennhold, H. Ott u. E. Roth:
Das Eiweißspektrum und seine klinische Bedeutung.
Klinik der Gegenwart, 1 (Urban u. Schwarzenberg,
München/Berlin 1955)
- 11) E. Wiedemann:
Schweiz. Med. Wochenschr. 76, 241 (1946)

- 12) E.R. Barry u. A. Chanutin:
J. Clin. Invest. 34, 1513 (1955)
- 13) F. Micheel u. H. Schweppe:
Naturw. 39, 380 (1952)
- 14) S. Datta, B. Overell u. M. Stock-Dunne:
Nature 164, 673 (1949)
- 15) T. Aronsson u. A. Grönwall:
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 9, 338 (1957)
- 16) J. Kohn:
Biochem. J. 65, 9 (1957)
- 17) O. Smithies:
Biochem. J. 61, 629 (1955)
- 18) P. Grabar u. C.A. Williams:
Biochem. Biophys. Acta 10, 193 (1953)
17, 67 (1955)
- 19) R. Doerr:
Die Immunitätsforschung, Bd. 3: Die Antigene
(Springer-Verlag, Wien 1948)
- 20) H. Ott:
Die medizinische Welt 51, 2697 (1960)
- 21) S. Raymond u. L.S. Weintraub:
Science 130, 711 (1959)
- 22) a) L. Ornstein u. B.J. Davis:
Discelectrophoresis, unpubl. (Reprinted by
Destillation Products Industries, Div.
Eastman Kodak & Co. Rochester, N.Y.)
b) R.A. Reisfeld, U.J. Lewis u. D.E. Williams:
Nature 195, 281 (1962)
c) U.J. Lewis:
J. Biol. Chem. 237, 3141 (1962)
d) J. Broome:
Nature 199, 179 (1963)
e) D.A. Burns:
J. Chromatogr. 11, 559 (1963)
- 23) W. Graßmann u. K. Hannig:
Hoppe-Seyler's Z. 290, 1 (1952)

- 24) Beckman, Technical Bulletin, August 1964
- 25) S. Raymond:
Clin. Chem. 8, 455 (1962)
- 26) J. Scheidegger:
Int. Arch. Allergy 7, 103 (1955)
- 27) G. Schwick:
Laboratoriumsblätter Behringwerke (Marburg-Lahn)
8, 11 (1958)
- 28) K. Hannig:
Z. Anal. Chem. 181, 244 (1961)
- 29) R. Caspani:
Minerva pediat (Torino) 5, 67 (1953)
- 30) H. Rafski:
Amer. J. med. Sci. 224, 522 (1952)
- 31) J. Edozien:
J. Clin. Pathol. 10, 276 (1957)
- 32) A. Le Gac, A. Sicé u. G. Viollier:
Bull. Soc. Pathol. Exot. 47, 108 (1954)
- 33) E. W. Bermes, jr. u. H.J. McDonald:
J. Chromatogr. 4, 34 (1960)
- 34) J.T. Clarke:
Annals of the New York Academy of Sciences 121, 428 (1964)
- 35) P. Grabar:
Adv. in Protein Chem. 13, 1 (1958)
- 36) L. Ornstein:
Annals of the New York Academy of Sciences 121, 325 (1964)

Lebenslauf

Ich bin in Asaba, Nigeria als Sohn des Volksschulrektors, Okoafu Isichei und seiner Ehefrau Nkenacho Isichei am 27. November 1932 geboren.

Nach 8 Jahren Volksschule besuchte ich 5 Jahre das St. Patrick's College, Asaba und legte dort 1952 die Reifeprüfung ab. Danach arbeitete ich 4 Jahre im Labor des Krankenhauses von Ibadan University, Nigeria, wo mein Interesse an der Laborarbeit geweckt wurde. Im Sommer 1959 begann ich mein Medizinstudium an der Universität in München. Nach dem vorgeschriebenen Probestudium machte ich im April 1960 mein Vorphysikum, im Februar 1962 das Physikum. Vom September 1962 bis April 1963 studierte ich an der Oxford University, England, anschließend ein Semester an der medizinischen Akademie in Düsseldorf. Seit November 1963 studiere ich wieder an der Universität in München, wo ich das medizinische Staatsexamen im Oktober 1965 mit der Note 2 bestand.

Ich bin sehr glücklich verheiratet mit meiner Frau, Elizabeth Mary Isichei, geb. Allo, die zur Zeit an der Oxford University in England ihre Doktorarbeit ausführt.

